

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Transferencia de plásmidos con resistencia a  
antibióticos en especies de enterococcus provenientes  
del Mar de Lima**

**TESIS**

para optar el título de Biólogo

**AUTOR**

Ada Lizbeth Sumi Jáuregui

**ASESORA**

Débora Alvarado Iparraguirre

**Lima - Perú**

**2008**

Dedicado a mis padres, Adalberto y Lourdes, quienes se esforzaron y me dieron todo su apoyo durante mi estudio universitario. Ellos son el motor que me impulsa a seguir adelante y superarme cada día más en mi desarrollo profesional.

Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles.

**Bertolt Brecht**

## AGRADECIMIENTOS

Antes que todos, y como creyente que soy, agradezco a Dios por haberme dado la libertad de escoger esta carrera y permitirme llegar hasta donde estoy.

Quiero agradecer a mis padres por su apoyo incondicional durante el desarrollo de esta tesis; y a mi hermana, por aguantarme y comprenderme.

Un especial agradecimiento a la profesora Débora Alvarado Iparraguirre, por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis, ser mi asesora y apoyarme con sus conocimientos y consejos. Gracias por su sinceridad.

Al Ph.D Christopher M. Pillar (Oxford, USA), quien me proporcionó información bibliográfica y me contactó con la Dra. Ana Lúcia da Costa Darini (Sao Paulo, Brasil), a la cual agradezco la donación de la cepa patrón *E. faecalis* JH2-2 para el desarrollo de mi tesis.

Un total agradecimiento a los miembros del Laboratorio de Microbiología Molecular, lugar donde realicé mi tesis. A los profesores: Dra. Juana Cocha, Dr. Pablo Ramírez y Mag. Ruth García, y junto con ellos a los ex miembros del laboratorio: Betty, Onofre, Alfredo, Lidia, Raquel, Jeannette, Coni, Michel, Verónica, Denis y Christian, con quienes tengo muchos recuerdos. Del mismo modo, agradezco a Beatriz, Julio, Carlitos y 'Guti', por su gran amistad brindada durante mi estadía en dicho laboratorio; sobretodo a mis

‘hermanos del laboratorio’ Ronnie, Yanina y Marcos, por su ayuda y ser más que mis amigos. De una manera especial, agradezco a Michael Jaramillo, quien me apoyó mucho durante el desarrollo de mi tesis, tanto como gran amigo y como miembro del laboratorio.

A mis amigos de pre-grado, que no menciono por temor de olvidarme de alguno, pero que siempre me apoyaron desde lejos; sobretodo a Frank Guzmán, quien ‘a pesar de todo’ es mi mejor amigo y casi hermano.

A las personas que me han lastimado, porque gracias a ellos soy una persona fuerte; a las personas que me han querido, por no permitir que mi corazón se endurezca.

# ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	9
<b>ABSTRACT</b>	11
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>II. ANTECEDENTES</b>	16
2. 1 Características generales y patogenicidad.	16
2.2 Resistencia a los antimicrobianos.	18
2.3 Transferencia Horizontal de genes.	21
2.3.1 Conjugación.	22
2.3.2 Transformación.	26
2.4 El género <i>Enterococcus</i> en ambientes marinos.	28
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	33
3.1 Materiales.	33
3.1.1 Cepas bacterianas.	33
3.1.2 Materiales de laboratorio y equipos.	33
3.2 Métodos	34
3.2.1 Reactivación de las cepas.	34
3.2.2 Pruebas de resistencia antimicrobiana.	35
3.2.2.1 Prueba de difusión en disco.	35
3.2.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	36
3.2.2.2.1 Evaluación de la CMI en cepas resistentes a ciprofloxacina.	36
3.2.2.2.2 Evaluación de la CMI en cepas resistentes a norfloxacina.	37

3.2.2.2.3 Evaluación de la CMI en cepas resistentes a estreptomicina.	38
3.2.2.2.4 Evaluación de la CMI en cepas resistentes a eritromicina.	39
3.2.2.2.5 Evaluación de la CMI en cepas con sensibilidad intermedia a rifampicina.	39
3.2.3 Curación de las cepas con dodecil sulfato de sodio (SDS)	40
3.2.3.1 Determinación de la concentración de SDS para la curación.	40
3.2.3.2 Curación de las cepas.	41
3.2.4 Prueba de conjugación.	41
3.2.4.1 Prueba de conjugación en cepas resistentes a ciprofloxacina.	42
3.2.4.2 Prueba de conjugación en cepas resistentes a norfloxacina.	43
3.2.4.3 Prueba de conjugación en cepas resistentes a eritromicina.	44
3.2.4.4 Prueba de conjugación en cepas resistentes a estreptomicina.	46
3.2.5 Extracción de DNA plásmidico.	47
3.2.6 Corrida electroforética de los plásmidos.	49
3.2.7 Prueba de Transformación.	49
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>51</b>
4.1 Resistencia a antimicrobianos por difusión en disco.	51
4.2 Concentración Mínima Inhibitoria.	52
4.3 Curación de plásmidos.	53
4.4 Cepas sensibles a rifampicina.	54
4.5 Recuento de transconjugantes.	54
4.6 Tamaño de los plásmidos.	56

4.7 Prueba de Transformación.	56
<b>V. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	57
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	66
<b>VII. CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS FINALES</b>	67
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	76
<b>IX. ANEXOS</b>	89
9.1 Tablas	89
9.2 Figuras	103
9.3 Medios de cultivo	113



## RESUMEN

El género *Enterococcus* es conocido por ser de origen fecal o intestinal, pero tiene una amplia distribución en la naturaleza y se le puede encontrar en suelos, aguas, plantas y en productos alimenticios, siendo capaz de sobrevivir en medios poco enriquecidos. Los estudios reportados sobre estos microorganismos generalmente inciden en su aspecto clínico y su resistencia a antibióticos, y algunos se ubican en un contexto ambiental evaluando métodos para su detección o enumeración para uso en aguas recreacionales. Está aumentando la importancia de este microorganismo como agente causal de infecciones adquiridas en hospitales, pero el interés de estudio en este género radica en su alta resistencia natural a múltiples antimicrobianos y a su capacidad de adquirir y transferir dicha resistencia.

Se sabe que *Enterococcus* es un microorganismo introducido al ecosistema marino debido a la contaminación de éste ambiente con desechos orgánicos, pero son pocos los reportes sobre estudios de resistencia antimicrobiana de éste género provenientes de muestras de agua de mar, siendo necesario este tipo de investigación que nos permita conocer la importancia de estos microorganismos en estos ambientes.

En la presente tesis se realizó un estudio utilizando 31 cepas del género *Enterococcus* aisladas de playas del litoral limeño. Empleando el método de difusión en disco se observó que la mayoría de cepas presentaban resistencia antimicrobiana a 12 diferentes antibióticos de uso

clínico, observándose que la mayoría de ellas era resistente a la estreptomycin. Se verificó si estas resistencias residían en plásmido mediante una prueba de curación con 0,003% de SDS. Se seleccionaron las cepas con resistencias plasmídicas a eritromicina, estreptomycin, ciprofloxacina y norfloxacina para ser sometidas al estudio de transferencia horizontal genética mediante las pruebas de conjugación y transformación a una cepa patrón, donde se observó que ocho cepas de *Enterococcus* transferían sus plásmidos de resistencia a eritromicina (1 cepa) y estreptomycin (7 cepas) con una frecuencia de transconjugantes que va desde  $1 \times 10^{-1}$  a  $9 \times 10^{-6}$ .

## ABSTRACT

The genus *Enterococcus* is recognized as being of fecal origin but have a wide distribution in nature, they can be found in soil, water, plants and food products, being able to survive in low-enriched media. Studies on these microorganisms usually affect their appearance and clinical resistance to antibiotics, and there are some who are placed in an environmental context, evaluating methods of detection or enumeration in waters for recreational use. It is increasing the importance of this microorganism as a causative agent of infections acquired in hospitals, but the interest in this kind of study lies in its high natural resistance to multiple antimicrobials and their ability to acquire and transfer the resistance. Despite that *Enterococcus* is a microorganism introduced to the marine ecosystem by contamination with organic wastes, there are few reports on studies of antimicrobial resistance of the *Enterococcus* genus water samples from the sea, being necessary to this type of research that allows us to know the importance of these microorganisms in these environments.

In this thesis, the study was conducted using 31 strains of the genus *Enterococcus* isolated of beaches in the coastal area Lima. Using the disk diffusion method was observed that the majority of antimicrobial resistance strains presented to 12 different clinical use of antibiotics to be used, noting that most of them were resistant to streptomycin. We assessed whether these resistances residing in a test using cure plasmid with 0,003% SDS. We selected strains with resistance plasmídicas erythromycin, streptomycin,

ciprofloxacin and norfloxacin to be subjected to the study of horizontal transfer through genetic testing conjugation and transformation, where we observed that eight strains of *Enterococcus* transferred its resistance plasmids to erythromycin (1 strain) and streptomycin (7 strains) with a frequency of transconjugantes ranging from  $1 \times 10^{-1}$  to  $9 \times 10^{-6}$ .

## I. INTRODUCCION

Los Enterococos son microorganismos que forman parte de la flora comensal de la región gastrointestinal y genitourinario del humano, mamíferos, aves e insectos. Sin embargo, son de amplia distribución en la naturaleza y se les puede encontrar en suelos, aguas, plantas y en productos alimenticios, siendo capaces de sobrevivir en medios poco enriquecidos. Actualmente han pasado de ser considerados comensales de baja patogenicidad a convertirse en importantes agentes de diversos cuadros infecciosos. El rol de *Enterococcus* como un causal de infecciones ha tenido un importante incremento no solamente por su potencial patogenicidad sino también por el incremento de su resistencia a diferentes antimicrobianos.

La resistencia antimicrobiana plantea una amenaza grave para la salud pública porque involucra nuevas especies bacterianas y nuevos mecanismos de resistencia que crea dificultades en el tratamiento de infecciones. Una de las principales razones del rápido incremento de la resistencia en enterococos está en la capacidad que tiene este microorganismo en adquirir y diseminar determinantes de resistencia a antimicrobianos; se ha reportado que un número de estos determinantes que otorgan resistencia a drogas reside en moléculas de DNA plasmídico (Woodford *et al*, 2003).

Se ha demostrado que especies del género *Enterococcus* que poseen alta resistencia a diferentes antimicrobianos tienen la capacidad de poder

transmitirla a otros microorganismos o a los de su mismo género a través de transferencia génica horizontal que involucra mecanismos de conjugación y transformación (Jett *et al*, 1994; Novais *et al*, 2005).

Los ambientes marinos costeros albergan diversos microorganismos, tanto autóctonos como alóctonos, siendo estos últimos de origen muy diverso. Dentro de ésta diversidad se encuentra el género *Enterococcus*, y en un estudio realizado por Guerrero (2005) a partir de muestras de aguas provenientes del litoral limeño se reportó la presencia de especies de enterococos tanto de origen humano y animal.

A pesar que *Enterococcus* es un microorganismo introducido al ecosistema marino por contaminación con desechos orgánicos cuya presencia ha sido ampliamente demostrada, los estudios sobre *Enterococcus* por lo general inciden en su aspecto clínico y su resistencia a antibióticos, habiendo algunos que se ubican en un contexto ambiental donde evalúan métodos de detección o enumeración en aguas para uso recreacional.

Son muy pocos los reportes a nivel nacional e internacional sobre estudios de resistencia a antimicrobianos del género *Enterococcus* provenientes de muestras de agua de mar, siendo necesario realizar investigación que nos permita conocer la importancia de estos microorganismos en estos ambientes. Por ello, se debe realizar estudios de resistencia a antimicrobianos en *Enterococcus* de origen marino, así como su implicancia e influencia en la posible transferencia de sus genes de

resistencia a otros microorganismos circundantes en nuestro ambiente marino.

Ante este contexto, es necesario saber si aquellas especies de *Enterococcus* presentes en nuestro litoral limeño poseen resistencia a antimicrobianos, y si esta resistencia puede ser transmitida y mantenerse así en este ambiente marino.

### **Objetivo General**

- Evaluar la transferencia de plásmidos con resistencia a antibióticos de uso clínico en especies de *Enterococcus* aislados de aguas del mar de Lima.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la resistencia a macrólidos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas en cuatro especies de *Enterococcus*.
- Determinar la naturaleza de la resistencia a antimicrobianos y seleccionar aquellas cepas que posean plásmidos para este tipo de resistencia.
- Determinar la frecuencia de transferencia, de los plásmidos de resistencia en estudio, a cepas de *Enterococcus* de referencia.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Características generales y patogenicidad

El género *Enterococcus* se ubica dentro del Orden *Lactobacillales* y la Familia *Enterococcaceae*. Sus miembros son cocos, Gram positivos, catalasa negativa, inmóviles, anaerobios facultativos, capaces de crecer en NaCl 6,5% y en el medio de bilis-esculina, tienen el antígeno del grupo D de Lancefield y no forman endosporas ni cápsulas (Suárez, 2002). Las especies de *Enterococcus spp* fueron originalmente incluidas en el género *Streptococcus*, pero en 1984 (Schleifer & Kilpper-Balz) fue formalizado el género *Enterococcus* después de estudios de hibridación DNA-DNA y de DNA-RNA demostrando una relación más distante con los estreptococos (Hancock & Gilmore, 2000). Actualmente, el género *Enterococcus* constituye un género bacteriano distinto cuyas especies más destacadas por su frecuencia de aislamiento como patógenos oportunistas son *E faecalis* y *E faecium*, mientras que el resto de las especies del género se aíslan con menor frecuencia (Sepúlveda y col, 2002; Pillar & Gilmore, 2004).

Las cepas de *Enterococcus spp* poseen propiedades fisiológicas que facilitan su caracterización fenotípica por métodos bioquímicos convencionales, sin embargo se han estandarizado diversos métodos moleculares, basados en el estudio de ácidos nucleicos, que permiten la identificación más rápida y precisa de los miembros del género *Enterococcus* (Manero & Blanch, 1999; Sepúlveda y col, 2002).



El hábitat natural de las especies de *Enterococcus* es el tracto gastrointestinal y genitourinario de humanos y animales de sangre caliente, sin embargo se le puede encontrar también como bacteria de vida libre en el suelo, plantas, productos alimenticios, agua de mar o asociados a invertebrados marinos (Manero & Blanch, 1999; Suárez, 2002; Wheeler *et al*, 2002; Kühn *et al*, 2003; Huys *et al*, 2004). La capacidad de sobrevivir en el ambiente externo se relaciona a su actitud excepcional para hacer frente a condiciones adversas, inclusive estudios fisiológicos mostraron que *E. faecalis* puede desarrollar respuestas adaptativas frente a diversos tipos de estrés a través de la síntesis de 'proteínas de estrés' que desempeñan probablemente un importante papel fisiológico (Rincé *et al*, 2002). Por tal motivo, la utilización de este microorganismo es cada vez más generalizada, sobretudo en la evaluación de la calidad de ambientes acuáticos, debido principalmente a su gran resistencia a factores ambientales (Borrego y Figueras, 1997).

Los enterococos han pasado de ser considerados comensales de baja patogenicidad y convertirse en una importante causa de infecciones hospitalarias (Bazet *et al*, 2005), siendo patógenos de importantes infecciones urinarias, infecciones de heridas intraabdominales, abscesos pélvicos, bacteriemias, endocarditis y ocasionalmente meningitis o neumonía (Palavecino, 2001; Maschieto *et al*, 2004). Aunque existen cerca de 18 diferentes especies de enterococos, cuya identificación se basa en su capacidad de resistencia a diferentes factores ambientales, solamente dos

son responsables de la mayoría de las infecciones en humanos: *E. faecalis* y *E. faecium* (Holt, 1994; Palavecino, 2001).

Si bien se debe reconocer que *Enterococcus* no es un microorganismo altamente patogénico, ni altamente invasivo, ni altamente infeccioso por su condición de comensal; el aumento de su importancia como agente causal de infecciones nosocomiales, donde *E. faecalis* es la especie predominante seguida de *E. faecium*, se debe a que han mostrado una alta frecuencia de resistencia frente a múltiples drogas (Hällgren *et al*, 2001; Calderón-Jaimes *et al*, 2003; Iversen *et al*, 2004; Sánchez-Molina y col., 2004).

## **2.2 Resistencia a los antimicrobianos**

Se ha podido apreciar que la rápida aparición de la resistencia antimicrobiana entre enterococos indudablemente también contribuye a su aparición como patógenos nosocomiales prominentes, creando dificultades en el tratamiento de infecciones ocasionadas por estos microorganismos (Hancock & Gilmore, 2000; Leavis *et al*, 2003).

En estos últimos años, los enterococos han mostrado que además de poseer resistencia intrínseca o natural a muchos agentes antimicrobianos, poseen gran capacidad para adquirir y mantener resistencia a diferentes antibióticos, como la recientemente reportada resistencia a vancomicina, mostrando del mismo modo resistencia a otras drogas terapéuticas como

penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, clindamicina y a altos niveles de aminoglicósidos (Murray, 1998; Chrystal, 2002; Mella *et al*, 2002; Tendolkar *et al.*, 2003; Alves d' Azevedo *et al*, 2004; Bazet *et al*, 2005).

Son varios los estudios de susceptibilidad antimicrobiana que se han realizado en especies del género *Enterococcus* provenientes de muestras clínicas (Ronconi *et al*, 2000; Hällgren *et al*, 2001), mostrando resistencia a un gran número de antibióticos, donde algunas especies son más resistentes que otras (Calderón-Jaimes y col, 2003).

Se ha reportado la presencia de enterococos con alta resistencia a ciprofloxacina y gentamicina (HLGR), planteándose que ésta última pueda estar asociada a elementos transponibles localizados en plásmidos o integrados en el cromosoma (Simjee *et al*, 1999; Woodford *et al*, 2003). Asimismo en estudios previos se ha demostrado que la resistencia a antimicrobianos, como las quinolonas, eran debidas a mutaciones de genes cromosómicos, sin embargo recientemente se han encontrado plásmidos multiresistentes que codifican resistencia a ciprofloxacina, ácido nalidixico y otras quinolonas (Tran & Jacoby, 2002).

Dentro de los estudios realizados sobre la sensibilidad del género *Enterococcus* a nuevos antimicrobianos se ha mostrado resistencia de alto grado a estreptomicina y eritromicina, donde *E.faecium* presenta una mayor proporción de cepas resistentes (Ronconi *et al*, 2000; Maniatis *et al*, 2001; Sánchez-Molina *et al*, 2004). Si bien, la resistencia a estreptomicina puede

ser debida a mutaciones ribosomales o modificaciones de la droga (Clark *et al*, 1999), se ha localizado un plásmido de resistencia a estreptomicina en *E. faecium* (Davis *et al*, 2005); además, en una publicación realizada por Clewell *et al* (1974) se caracterizó tres plásmidos diferentes en una cepa de *Streptococcus faecalis*, donde uno de ellos era portador de resistencia a eritromicina.

En otro estudio realizado por Flannagan *et al* (2003) se encontró que un aislado clínico de *Enterococcus faecalis* poseía dos plásmidos, donde uno de ellos era de amplio rango y codificaba resistencia a vancomicina, y el otro plásmido codificaba resistencias a gentamicina, estreptomicina y eritromicina.

Se han aislado también enterococos en ambientes no hospitalarios, tales como áreas de producción de aves de corral y en muestras de heces de estos animales, encontrándose enterococos multiresistentes a los antimicrobianos usados en la medicina humana (Hayes *et al*, 2004). También se han aislado diferentes especies de enterococos en muestras de alimentos, donde se ha reportado la transferencia de genes de virulencia y resistencia a diferentes antibióticos y la participación de elementos genéticos móviles para su transferencia (Eaton *et al*, 2001; Huys *et al*, 2004).

Se ha observado entonces, que la adquisición de resistencia a antibióticos puede ocurrir por mutaciones (en el cromosoma de la bacteria) o a través de la transferencia horizontal de los genes de resistencia, los cuales

se pueden encontrar localizados en diferentes tipos de elementos móviles de DNA (Huycke *et al*, 1998; Dzidic & Bedeković, 2003). Por este motivo, vemos que la importancia del género *Enterococcus* radica en su alta resistencia natural a múltiples antimicrobianos y a su capacidad de adquirir resistencia a otros (Chrystal, 2002), porque ha creado dificultades en el tratamiento de infecciones (Alves d' Azevedo *et al*, 2004).

Instituciones internacionales recomiendan el estudio de enterococos aislados de ambientes no humanos para la mejor comprensión de uno de los microorganismos que más problemas está dando en la actualidad en relación a su enorme capacidad para la adquisición y mantenimiento de resistencia a antimicrobianos (Confer. Intern. sobre Enterococos-ASM, Canadá, 2000).

## **2.3 Transferencia horizontal de genes**

La transferencia horizontal de genes permite que elementos genéticos móviles se puedan intercambiar promiscuamente entre un amplio espectro de bacterias y así contribuir a la plasticidad del genoma bacteriano (Sorensen *et al*, 2005). Esto puede dar lugar a grandes cambios y adquisición de nuevas funciones que ayuden a la bacteria en la adaptación a un nuevo ambiente (Garcia-Vallvé *et al*, 2000).

Esta transferencia se puede realizar a través de secuencias de inserción, transposones, integrones, bacteriófagos, islas genómicas, plásmidos o las combinaciones de éstos elementos (Sorensen *et al*, 2005),

involucrando mecanismos de conjugación, transformación o transducción (Dzidic & Bedekovic', 2003).

Los *Enterococcus* poseen una única y gran capacidad de intercambiar material genético entre sí mismos y con otros géneros, involucrando así la transferencia de genes de virulencia, de resistencia a metales pesados y antimicrobianos (Jett *et al*, 1994; Novais *et al*, 2005).

### **2.3.1 Conjugación**

La conjugación de plásmidos es la vía mas eficiente en la transferencia horizontal de genes y es considerada una de las mayores razones del incremento de bacterias multiresistentes a antibióticos (Kurenbach *et al*, 2003).

Por un largo tiempo se pensó que la conjugación sólo ocurría en enterobacterias y fue descrita para numerosos géneros de bacterias Gram-negativas; sin embargo en el año 1964 se demostró que los estreptococos también poseían mecanismos de transferencia génica. En un estudio realizado en *Streptococcus bovis* y *Enterococcus faecalis* se demostró la transferencia conjugativa de un gen de resistencia a tetraciclina con un índice de transconjugantes de  $10^{-6}$ , que junto con trabajos realizados en *Streptococcus faecalis*, sugirió la transferencia de material genético por conjugación en bacterias Gram positivas (Raycroft & Zimmerman, 1964; LeBlanc *et al*, 1978; Hespell & Whitehead, 1991; Moat, *et al* 2002).

Debido a que los enterococos estaban incluidos dentro del grupo de los estreptococos, muchos estudios de conjugación realizados en *Enterococcus* están basados en trabajos reportados para el género *Streptococcus*.

Un importante mecanismo para la transferencia horizontal de la resistencia a antibióticos en enterococos es la conjugación inducida por feromonas (Schlievert, 1998). Una cepa receptora de *Enterococcus* puede producir varias feromonas distintas, provocando una respuesta conjugativa en diferentes cepas donadoras según el plásmido que porten (Clewell *et al*, 2002; Bazet, 2005).

Un grupo de plásmidos altamente conjugativos son comúnmente encontrados y clasificados en *Enterococcus*; por ejemplo en *Enterococcus faecalis* hay dos categorías de plásmidos conjugativos: el primer grupo es transferido con alta frecuencia de transferencia en caldo ( $10^{-3}$  a  $10^{-1}$  por célula donadora), mientras que los miembros del segundo grupo transfieren pobremente en caldo pero son eficientes en filtros de membrana. La razón de esta diferencia involucra la producción de feromonas sexuales (De Boever, 2000; Moat, *et al* 2002).

Por tal motivo una característica conocida hasta el momento y que ocurre exclusivamente en enterococos es la implicancia de estas feromonas sexuales en la transferencia de ciertos plásmidos conjugativos. Tales plásmidos, pueden transferirse con una frecuencia cercana al 100% bajo condiciones óptimas, son ubicuos en *E. faecalis*, y hay evidencia que ello

facilita la movilización de plásmidos no conjugativos (Francia & Clewell, 2002).

Debido a que los elementos conjugativos pueden ser responsables del reciente incremento de bacterias patógenas que muestran resistencia múltiple a muchos antibióticos, se ha ido incrementando el interés en la transferencia y adquisición de genes de resistencia a antibióticos por bacterias en el ambiente, donde muchos géneros bacterianos ha mostrado participar en el intercambio genético por conjugación. En Gram positivos, particularmente *Streptococcus* y *Enterococcus*, los genes conjugativos se encuentran tanto en plásmidos como en transposones, despertando un enorme interés la capacidad de *Enterococcus* para movilizar estos elementos genéticos, sobretodo al entrar en contacto con organismos ambientales (Haack *et al*, 1994).

Es sabido que los plásmidos que responden a feromonas son altamente transmisibles entre cepas de *E.faecalis* y se cree que contribuyen a la diseminación horizontal de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia (Flannagan & Clewell, 2002).

En estudios previos se ha demostrado que plásmidos y transposones se transfieren fácilmente entre especies de *Enterococcus* (Eaton *et al*, 2001). Uno de los reportes demostró la transferencia por conjugación, de plásmidos conteniendo genes de resistencia a estreptogramina, de *Enterococcus faecalis* a *E. faecalis* y de *Enterococcus faecalis* a *E. faecium*, con una frecuencia que variaba entre  $1 \times 10^{-2}$  a  $8 \times 10^{-3}$ , implicando a *E. faecalis* como



reservorio de genes de resistencia a este antibiótico que pueden ser transferidos (Simjee *et al*, 2002). En otro estudio se demostró que la información genética puede ser transferida por conjugación de *E. faecium* a *E. coli*. y viceversa con una frecuencia promedio de  $5 \times 10^{-9}$  por colonia, donde la transferencia fue realizada en filtros de membrana de nitrocelulosa (Trieut- Cuot *et al*, 1988). Del mismo modo, se mostró la transferencia, por conjugación, de un plásmido con resistencia a kanamicina de *E. faecalis* a *E. coli* en tractos gastrointestinales de ratones, con una frecuencia de  $3 \times 10^{-9}$ , indicando que la conjugación es un mecanismo que podría explicar el flujo del genes de resistencia de Gram-positivas a bacterias Gram-negativas observadas en la naturaleza (Doucet-Populaire *et al*, 1992).

Se ha demostrado que la habilidad de diferentes elementos móviles para cooperar en la transferencia genética es una herramienta para la diseminación de determinantes de resistencia antimicrobiana que ocurre entre géneros Gram-positivos (Rice & Carias, 1998).

Marcinek *et al*. (1998), demostraron la transferencia de plásmidos y transposones, entre cepas de *E. faecalis* bajo condiciones naturales en tres plantas de tratamiento de aguas residuales, que al ser comparados con trabajos realizados en condiciones de laboratorio, presentaban una tasa de frecuencia baja, sin embargo eran mensurables. Kurenbach *et al*. (2003) reporta que la transferencia horizontal de un plásmido conjugativo es sumamente eficiente por lo que es considerada como una de las mayores razones del incremento de bacterias resistentes a antibióticos.

Los *Enterococcus* son elegidos en trabajos de conjugación porque han mostrado tener muchos genes de resistencia que son transferidos por este mecanismo. Se ha encontrado que suelos, con deposición de material fecal, poseen una elevada población de enterococos que portan genes de resistencia antimicrobiana, pudiendo ser la conjugación una forma para la introducción de este material al ambiente (Haack *et al*, 1994).

### **2.3.2 Transformación**

La transformación es uno de los mecanismos de transferencia génica bacteriana donde la célula capta DNA foráneo y lo incorpora a su genoma. Esta captación e incorporación de material genético es dependiente de la capacidad o competencia bacteriana que varía entre las diferentes especies (Dzidic & Bedekovic', 2003).

La transformación en *Enterococcus* ha sido basada en estudios realizados en *Streptococcus*, principalmente *Streptococcus pneumoniae* (Moat, 2002), donde los trabajos de transformación genética de DNA y plasmídico entre varias especies de *Streptococcus* están generalmente asociados a resistencia a antibióticos (Le Blanc, 1976; Davison *et al*, 1976)

El estado de competencia es inducido por una proteína específica que es secretada por la misma bacteria, un péptido de estimulación de la competencia (CSP) de 17 aminoácidos. En condiciones apropiadas el CSP es procesado, exportado de la célula, y se acumula en el medio de

crecimiento hasta una determinada densidad celular, donde este péptido activador se une a receptores de la membrana plasmática y desarrolla en la célula la capacidad de captar DNA exógeno (Lacks, 2001; Moat, 2002).

*Streptococcus* posee un natural estado de competencia que persiste por corto periodo (Moat *et al*, 2002). Existen varios métodos eficientes de transformación que se han realizado en diferentes especies de *Streptococcus*, una de ellas es la transformación de *Streptococcus faecalis* a partir de la obtención de protoplastos como la realizada por Wirth *et al* (1986), donde se clonó un plásmido y se obtuvieron  $10^6$  células transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA en 48h, demostrando la utilidad de este sistema. Otro sistema de transformación utilizado en *Streptococcus thermophilus*, es la electroporación, la cual es considerada una técnica simple y eficaz para introducir DNA plasmídico y muy útil en el desarrollo de la tecnología de DNA recombinante (Somkuti, 1988). Esta técnica también ha sido empleada en diferentes especies de *Enterococcus* e inclusive en este caso no se utilizaron protoplastos para la electroporación, obteniéndose  $4 \times 10^6$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico, siendo considerada una técnica rápida y eficiente debido a que todas las especies estudiadas: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. malodoratus* y *E. mundtii*, fueron transformadas (Friesenegger *et al*, 1991).

Son pocos los estudios donde se empleen métodos para una transformación natural en especies de *Enterococcus*; la mayoría se basa en metodologías modificadas de reportes antiguos realizados en especies de

*Streptococcus* y, en otros se utiliza el péptido inductor del estado de competencia (CSP) purificado o sintético para estimular la competencia (Hávarstein, 1985).

Varios reportes muestran una transferencia genética altamente eficiente entre cepas de *E. faecalis* bajo condiciones de laboratorio; pero bajo condiciones ambientales, en plantas de tratamiento de aguas residuales por ejemplo, las eficacias caen a límites muy bajos, aunque pueden evaluarse (Marcinek *et al*, 1998). También se ha relatado la transformación en biopelículas *in vitro*, donde se demuestra que este estado influye grandemente en la competencia y otorga la habilidad para transportar e integrar DNA foráneo, siendo éste un pre-requisito para entender el mecanismo de transformación genética que ocurre en la naturaleza (Li *et al*, 2001).

## **2.4 El género *Enterococcus* en ambientes marinos**

El rápido crecimiento de la población y desarrollo urbano ha dado lugar a problemas en las salidas de aguas residuales y contaminación de playas, convirtiéndose éste en un foco de preocupación de la seguridad pública, ya que se han reportado infecciones de ojos, oídos, piel y cuadros de gastroenteritis, por exposición a aguas recreacionales marinas (Turbow *et al*, 2003).

Los *Enterococcus* se encuentran formando parte de la flora del tracto gastrointestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, por tal

motivo estos microorganismos son excretados en sus heces, de ahí que su presencia en el ambiente indique contaminación de origen fecal y el riesgo de aparición de patógenos (Suárez, 2002).

Diversos estudios han mostrado que las aguas servidas constituyen un reservorio importante de cepas de enterococos resistentes a los antibióticos, siendo *E.faecalis* y *E.faecium* las especies aisladas con mayor frecuencia (Torres *et al*, 1994; Blanch *et al*, 2003). También, se ha señalado una posible ruta de transmisión de enterococos resistentes, desde pacientes hospitalizados a los emisarios de aguas servidas del hospital y aguas servidas urbanas, donde a través de la vía de las plantas de tratamiento para aguas superficiales pueden regresar al ser humano (Iversen *et al*, 2004). Se ha reportado la presencia de enterococos en aguas servidas y plantas de tratamientos de agua residuales, encontrándose aislados resistentes a diferentes antibióticos ( Ferreira da Silva *et al*, 2005; Silva *et al*, 2005)

La existencia de factores ambientales marinos tales como pH, salinidad, temperatura, radiación solar, tensión osmótica, deficiencia de nutrientes, turbidez, concentraciones de oxígeno y composición microbiana de la comunidad, influyen en la inactivación de las bacterias una vez que éstas alcanzan los desagüaderos o ambientes acuáticos (Noble *et al*, 2004); sin embargo los enterococos han mostrado tener una relativa resistencia a tales condiciones adversas como la tolerancia a condiciones extremas de temperaturas, pH y salinidad, y eso ha sido ventajoso para el mantenimiento de estos microorganismos en estos ambientes, por lo que los riesgos en

aguas naturales destinadas a la recreación, tales como infecciones y enfermedades del tracto respiratorio y gastrointestinal, han ocasionado que algunos investigadores recomienden al grupo enterococo como el indicador de contaminación más apropiado en aguas marinas, ya que sobreviven en ellas, inclusive más que los coliformes fecales (Suárez, 2002).

Varios patógenos e indicadores de contaminación fecal pueden persistir como organismos viables en ambientes naturales, debido a su capacidad de activar diversos tipos de estrategias de la supervivencia (Signoretto *et al*, 2005). Una de estas estrategias incluye la adherencia a superficies abióticas, tal como lo demostró un estudio donde se reportó la acumulación de bacterias indicadoras fecales en sedimentos marinos, mediante la adsorción de estos microorganismos a las partículas suspendidas en agua, donde se pudo evidenciar la presencia de 100 a 1000 veces más bacterias en el sedimento, que en el agua (Davies *et al*, 1995; Anderson *et al*, 2005).

Otras estrategias incluyen la adherencia a superficies bióticas y adoptar un estado viable pero no cultivable (VBNC). En un reporte de detección de enterococos en agua de lago y de mar se demostró que *Enterococcus faecalis* puede ser detectado sobre el plancton y en estado VBNC (Signoretto *et al*, 2004; Lleò *et al*, 2005). En otro estudio, se demostró que la adherencia *in vitro* de *E. faecalis* a copépodos acelera la entrada de éstos microorganismos al estado VBNC en relación con las bacterias planctónicas. Estas células de *E. faecalis* en estado de VBNC mantuvieron

sus características adhesivas a los copépodos y a su quitina, aunque a un grado reducido en comparación con las células en crecimiento. Estos resultados indicaron que los copépodos pueden representar un depósito ambiental adicional de enterococos (Signoretto *et al*, 2005).

El predominio de bacterias resistentes a antimicrobianos, en ambiente acuáticos, pueden transmitirse, pudiendo causar infecciones en seres humanos. Esta diseminación directa de la resistencia desde ambientes acuáticos a los seres humanos puede ocurrir debido al mal consumo de los productos alimenticios o a través del agua, pudiendo ser entonces por contacto directo con el agua o con los organismos acuáticos. Esta propagación se puede dar a través de la transferencia horizontal del genes presentes en estas bacteria resistentes (OPS, 2005).

Es necesario indicar que actualmente se utilizan técnicas moleculares, tales como PCR, para la identificación de especies de *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de muestras ambientales provenientes de aguas residuales, de río, lago y agua de mar (Harwood *et al*, 2004); del mismo modo se ha empleado RNAr 16S para la identificación de especies de *Enterococcus* de muestras de ambiente marino (Moore *et al*, 2006); y además se está utilizando a *Enterococcus* como indicador bacteriano en aguas marinas recreacionales, existiendo actualmente estándares internacionales para este microorganismo en este tipo de ambientes (Noblea *et al*, 2003).

Se está tomando importancia del peligro que puede causar la presencia de estos microorganismos resistentes a antibióticos en ambientes acuáticos. En un reciente reporte se ha estudiado la composición de especies del género *Enterococcus* en piscigranjas integradas y tradicionales en Tailandia, así como la identificación de genes de resistencia a antimicrobianos presentes en estas cepas (Petersen & Dalsgaard, 2003).

En la ciudad de Lima, el 86% del agua del desagüe va directamente al mar, generando contaminación del agua del litoral y deterioro en la calidad de las playas de Lima (CONAM, 2000). La descarga de desagües, dada su peligrosidad para la salud humana, ha sido motivo de mayor estudio y control; sin embargo, existen problemas debido al rápido crecimiento de las poblaciones, al desarrollo de aglomeraciones costeras, a los nuevos balnearios, entre otros (Zumarán, 1996).

En un trabajo reportado por Guerrero y Alvarado (2005), se identificaron diferentes especies del género *Enterococcus*, provenientes de muestras de agua de mar de la zona costera limeña. Entre estos aislados se encontraban especies de origen humano que frecuentemente están asociadas con infecciones clínicas.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Cepas Bacterianas

Se utilizaron 31 cepas de *Enterococcus* aisladas de las cuatro bahías que conforman la costa de Lima (Callao, Pucusana, Miraflores y Ancón) y que fueron identificadas previamente como: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* y *E. durans*, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM (Guerrero & Alvarado, 2005; Tabla 1).

En las pruebas de resistencia a antibióticos se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como cepa control.

En las pruebas de transferencia genética por conjugación y transformación se utilizó la cepa de *Enterococcus faecalis* JH2-2 F<sup>-</sup>, libre de plásmido y con resistencia cromosómica a rifampicina, donado gentilmente por la Dra. Ana Lúcia da Costa Darini de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

##### 3.1.2. Materiales de laboratorio y equipos.

Se utilizaron los equipos del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas.

## **3.2 Métodos**

Se inició con la reactivación de todas las cepas de *Enterococcus* disponibles, posteriormente se les realizó una prueba de susceptibilidad a diferentes antibióticos, seguido de una prueba de curación a las cepas resistentes a determinados antibióticos, y finalmente se realizaron pruebas de conjugación y transformación, para el análisis de transferencia de las resistencias a antimicrobianos.

### **3.2.1 Reactivación de las cepas**

Las 31 cepas de *Enterococcus* fueron sembradas en tubos conteniendo 3mL de caldo Brain Heart Infusión (BHI) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Luego, se tomó un inóculo de los caldos y se sembró por estriado en placas de Petri con agar BHI y fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Pasado este tiempo, se tomaron las mejores colonias características de *Enterococcus*, se sembraron en agar selectivo Bilis esculina y se incubó a 37°C por 24-48 h. Después, se tomaron colonias características de *Enterococcus* y se sometieron a tinción Gram para posteriormente ser sembradas en caldo Luria-Bertoni (LB), los tubos se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente, para su mantenimiento, las cepas fueron sembradas en viales conteniendo agar Luria Semisólido y en crioviales conteniendo glicerina (50%) para su conservación a temperatura ambiente y a -30°C, respectivamente, para estudios posteriores.

### 3.2.2 Pruebas de resistencia antimicrobiana

#### 3.2.2.1 Prueba de Difusión en Discos

Primero se realizó una prueba de sensibilidad antibiótica por el método de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966) a las 31 cepas de *Enterococcus* aisladas del mar y a las cepa *Staphylococcus* de referencia. Se utilizaron 12 antibióticos de uso clínico: eritromicina (EM), penicilina (P), estreptomicina (S), ciprofloxacina (Cip), levofloxacina (LVX), norfloxacina (Nor), tetraciclina (Te), rifampicina (R), cloramfenicol (C), vancomicina (VA), azitromicina (AZT) y clindamicina (DA) (Tabla 2).

La prueba de susceptibilidad se elaboró de acuerdo al *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión* de la *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS/CLSI, 2004).

La preparación del inóculo se realizó a través del método de desarrollo previo, donde las cepas fueron sembradas previamente en caldo BHI durante 24 h a 37°C y posteriormente se sembraron en agar BHI para la selección de las colonias adecuadas de *Enterococcus*. Se tomaron las mejores colonias y se sembraron en caldo BHI a 37°C hasta la concentración de 0,5 en la escala de MacFarland. A partir de esto, con la ayuda de hisopos estériles, se tomó un inóculo y se diseminó sobre agar Mueller-Hinton contenido en una placa de Petri, tratando de esparcirlo sobre toda la superficie del agar y no dejar espacios. Luego, con la ayuda de

pinzas estériles, se colocaron de 6 a 7 discos de antibiótico por placa. El tiempo de incubación varió dependiendo del antibiótico y la medida del diámetro de los halos de inhibición se estableció en milímetros, todo esto basado en los estándares proporcionados por el manual NCCLS/CLSI (2004).

### **3.2.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Dependiendo de los resultados previos de la prueba de sensibilidad, se evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a las cepas que fueron resistentes o mostraron sensibilidad intermedia a estreptomicina, eritromicina, ciprofloxacina y levofloxacina. Se procedió a hacer la CMI a todas las cepas para determinar y confirmar si la resistencia era alta o baja a los antibióticos considerados en el estudio.

#### **3.2.2.2.1 Evaluación de la CMI en cepas resistentes a Ciprofloxacina**

La prueba de la CMI realizada a las cepas resistentes y/o intermedias a ciprofloxacina, se basó en el *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión* (NCCLS/CLSI, 2004).

Se preparó el antibiótico según la tabla 3, a una concentración de 12,8 mg/mL, a partir de la cual se realizaron ocho diluciones, de acuerdo al manual: 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL y 160 µg/mL .

Cada cepa fue sembrada en 3 mL de caldo LB e incubada a 37 °C hasta la concentración de 0,5 de la escala de Mac Farland, luego se tomó un inóculo de 10 µL y fue sembrado por moteado en placas con agar Mueller-Hinton conteniendo cada una de las diferentes concentraciones del antibiótico. En cada placa se colocaron 18 inóculos de las diferentes cepas. El tiempo de incubación y lectura se establecieron en base al Manual de procedimientos NCCLS/CLSI (2004).

#### **3.2.2.2.2 Evaluación de la CMI en cepas resistentes a norfloxacin**

La prueba de la CMI realizada a las cepas resistentes y/o intermedias a norfloxacin, se basó en el *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión* (NCCLS/CLSI, 2004).

Se preparó el antibiótico según la tabla 4, a una concentración de 3,2 mg/mL, a partir de la cual se realizaron siete diluciones, de acuerdo al manual: 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL y 80 µg/mL.

Cada cepa fue sembrada en 3 mL de caldo LB e incubada a 37 °C hasta la concentración de 0,5 de la escala de Mac Farland, luego se tomó un inóculo de 10 µL y fue colocado por moteado en placas estériles con agar Mueller-Hinton conteniendo cada una de las diferentes concentraciones del antibiótico. En cada placa se colocaron 10 inóculos de las diferentes cepas.

El tiempo de incubación y lectura estuvieron basados en el Manual NCCLS/CLSI (2004).

#### **3.2.2.2.3 Evaluación de la CMI en cepas resistentes a estreptomicina**

La prueba de la CMI realizada a las cepas resistentes y/o intermedias a estreptomicina, se basó en el *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión* (NCCLS/CLSI, 2004).

Se preparó el antibiótico según la tabla 5, a una concentración de 96 mg/mL, a partir de la cual se realizaron ocho diluciones, de acuerdo al manual: 37,5 µg/mL, 75 µg/mL, 150 µg/mL, 300 µg/mL, 600 µg/mL, 1200 µg/mL y 2400 µg/mL.

Cada cepa fue sembrada en 3 mL de caldo LB e incubada a 37 °C hasta la concentración de 0,5 de la escala de Mac Farland, luego se tomó un inóculo de 10 µl y fue colocado por moteado en placas estériles con agar Mueller-Hinton conteniendo cada una de las diferentes concentraciones del antibiótico. En cada placa se colocaron los inóculos de las diferentes cepas. El tiempo de incubación y lectura estuvieron basados en el Manual NCCLS/CLSI (2004).

#### **3.2.2.2.4 Evaluación de la CMI en cepas resistentes a eritromicina**

La prueba de la CMI realizada a las cepas resistentes y/o intermedias a eritromicina, se basó en el *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión* (NCCLS/CLSI, 2004).

Se preparó el antibiótico según la tabla 6, a una concentración de 9,6 mg/mL a partir de la cual se realizaron siete diluciones, de acuerdo al manual: 3,75 µg/mL, 7,5 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL, 60 µg/mL, 120 µg/mL y 240 µg/mL.

Cada cepa fue sembrada en 3 mL de caldo LB e incubada a 37 °C hasta la concentración de 0,5 de la escala de Mac Farland, luego se tomó un inóculo de 10 µl y fue colocado por moteado en placas estériles con agar Muller-Hinton conteniendo cada una de las diferentes concentraciones del antibiótico. En cada placa se colocaron 14 inóculos de las diferentes cepas. El tiempo de incubación y lectura se basaron en el Manual NCCLS/CLSI (2004).

#### **3.2.2.2.5 Evaluación de la CMI en cepas con sensibilidad intermedia a rifampicina**

Se seleccionaron aquellas cepas que presentaban sensibilidad intermedia a rifampicina. Para esto se trabajó con cinco concentraciones del

antibiótico: 1,875 µg/mL, 3,75 µg/mL, 7,5 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL y 60 µg/mL, además de un control sin antibiótico.

### **3.2.3 Curación de las cepas con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)**

Para poder determinar si la resistencia presente en las cepas de *Enterococcus* es debido a la presencia de plásmido, se procedió al curado de las cepas resistentes a los diferentes antibióticos. Se seleccionaron las cepas resistentes a norfloxacin, ciprofloxacina, eritromicina y estreptomicina que no presenten resistencia a Rifampicina. Para el proceso de curación se trabajó con una solución madre de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10% y se determinó la concentración mediante el procedimiento que se describe a continuación.

#### **3.2.3.1 Determinación de la concentración de SDS para la curación.**

Para determinar la concentración adecuada de SDS para la curación, se sembraron cuatro cepas de diferentes especies de *Enterococcus* (*E. faecalis* 43, *E. faecium* 70, *E. hirae* 15 y *E. durans* 10) en 3 mL de caldo LB conteniendo 19 diferentes concentraciones de SDS, desde 0,0002% hasta 1%, los tubos se dejaron incubando a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se tomaron las concentraciones máximas en las cuales crecía cada una de las cepas, las cuales se encontraban entre 0,002% - 0,004 %, y se procedió a realizar una prueba de sensibilidad por el método de disco difusión, observando la susceptibilidad de las cepas frente a los diferentes antibióticos a los que previamente eran resistentes.



### **3.2.3.2 Curación de las cepas**

Con lo obtenido anteriormente, se procedió a realizar la curación de las cepas de *Enterococcus* resistentes a los cuatro diferentes antimicrobianos, para lo cual se utilizó SDS al 0,003%. Para este proceso, de sembraron cada una de las cepas en 3 mL de caldo LB conteniendo SDS y se dejó incubando a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se realizó una prueba de sensibilidad por el método de disco difusión a cada una de las cepas para verificar si las resistencias se perdían o se mantenían.

### **3.2.4 Prueba de conjugación**

Es necesario indicar que en los estudios de transferencia horizontal se tomaron en cuenta tres criterios para la selección de las cepas resistentes: 1) que presenten alta frecuencia de resistencia a un determinado antibiótico, 2) que no corresponda a la resistencia de la cepa receptora y, 3) que no sea reportado como una resistencia natural.

Para esta prueba se utilizaron como cepas donadoras, a los *Enterococcus* que no eran sensibles a rifampicina y que presentaban resistencia plasmídica a eritromicina, estreptomicina, ciprofloxacina o norfloxacina; es decir, aquellas cepas que hayan mostrado sensibilidad después de la curación. Como cepa receptora se utilizó la cepa JH2-2 libre de plásmido, con resistencia cromosómica a rifampicina. Se siguieron las recomendaciones de Huapaya (1995) y Gerardht (1994).

### **3.2.4.1 Prueba de conjugación de cepas resistentes a ciprofloxacina**

Para esta prueba se sembraron las cepas donadoras, resistentes a ciprofloxacina, en 3 mL de caldo BHI conteniendo 10 µg/mL de ciprofloxacina y la cepa receptora se sembró en 3 mL de caldo BHI conteniendo 72 µg/mL de rifampicina y fueron incubados a 37° C por toda la noche y sin aireación. Transcurrido este tiempo, se tomó un inóculo de cada una de las cepas donadoras y se sembró en diferentes tubos conteniendo 4 mL de caldo BHI con 10 µg/mL de ciprofloxacina. La cepa receptora se sembró en un tubo con 8 mL de caldo BHI conteniendo rifampicina (72 µg/mL), se dejó a temperatura ambiente y con aireación hasta alcanzar la concentración de 0,5 en la escala de Mac Farland.

Cuando se alcanzó la concentración deseada, se tomó 4mL del cultivo de la cepa receptora con 2 mL de la donadora y se mezclaron estas cantidades en un tubo vacío estéril y se mantuvo a temperatura ambiente y sin agitación por toda la noche. Además, para saber el número aproximado de las células donadoras que van a participar en la conjugación, se hace un recuento de donadoras, para lo cual se realizaron seis diluciones seriadas del cultivo de la cepa donadora, con solución salina, y se trabajó con las últimas 3 diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) de las cuales se tomó 100 uL y se diseminó sobre Agar BHI con ciprofloxacina. Se incubó a 37°C por toda la noche.

Transcurrido este tiempo, se interrumpió la conjugación mediante agitación en vortex por 30s y se procedió a hacer el recuento de

transconjugantes, para lo cual se tomó 100 µL de cada uno de los cultivos mixto y se diseminó sobre Agar BHI conteniendo 10 µg/mL de ciprofloxacina y 72 µg/mL de rifampicina. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 24h.

También se realizaron siembras controles, donde los cultivos de las cepas donadoras y receptora fueron sembrados por estrías en placas con agar BHI conteniendo ciprofloxacina, y también en placas con agar BHI con rifampicina. Fueron incubadas a 37° C por 24 h.

#### **3.2.4.2 Prueba de conjugación de cepas resistentes a Norfloxacin**

Para esta prueba se sembraron las cepas donadoras, resistentes a norfloxacin, en 3 mL de caldo BHI conteniendo 15 µg/mL norfloxacin y la cepa receptora se sembró en 3 mL de caldo BHI conteniendo 72 µg/mL de rifampicina. Las placas fueron incubadas a 37° C por toda la noche y sin aireación. Transcurrido este tiempo, se tomó un inóculo de cada una de las cepas donadoras y se sembraron en diferentes tubos conteniendo 4 mL de caldo BHI con norfloxacin (15 µg/mL). La cepa receptora se sembró en un tubo con 8 mL de caldo BHI conteniendo rifampicina (72 µg/mL), se dejó a temperatura ambiente y con aireación hasta que alcanzó la concentración de 0,5 en la escala de Mac Farland.

Una vez alcanzada la concentración deseada, se tomó 4 mL del cultivo de la cepa receptora con 2 ml de la donadora y se mezclaron estas cantidades en un tubo vacío estéril y se mantuvo a temperatura ambiente y sin agitación por toda la noche.

Para saber el número aproximado de las células donadoras que van a participar en la conjugación, se hace un recuento de donadoras, para lo cual se realizaron seis diluciones seriadas del cultivo de la cepa donadora, con solución salina, y se trabajó con las 3 últimas diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) de las que se tomaron 100  $\mu$ L que se diseminaron sobre agar BHI con norfloxacin. Se incubó a 37°C por toda la noche.

Al día siguiente, se interrumpió la conjugación mediante agitación en vortex por 30s y se procedió a hacer el recuento de transconjugantes. Para esto se tomó 100  $\mu$ L del cultivo mixto y se diseminó sobre BHI conteniendo 15  $\mu$ g/mL de norfloxacin y 72  $\mu$ g/mL de rifampicina. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 h.

También se realizaron siembras controles, donde los cultivos de las cepas donadoras y receptora fueron sembrados por estrías en placas con agar BHI conteniendo norfloxacin, y también en placas con agar BHI con rifampicina. Fueron incubadas a 37° C por 24 h.

#### **3.2.4.3 Prueba de conjugación de cepas resistentes a eritromicina**

Para esta prueba se sembraron las cepas donadoras, resistentes a eritromicina, en 3 mL de caldo BHI conteniendo 22  $\mu$ g/mL de eritromicina y la cepa receptora se sembró en 3 mL de caldo BHI conteniendo 70  $\mu$ g/mL de rifampicina y fueron incubados a 37° C por toda la noche y sin aireación. Transcurrido este tiempo, se tomó un inóculo de cada una de las cepas donadoras y se sembraron en diferentes tubos conteniendo 4 mL de caldo

BHI con eritromicina (22 µg/mL). La cepa receptora se sembró en tubos con 8 mL de caldo BHI conteniendo rifampicina (72 µg/mL), se dejó a temperatura ambiente y con aireación hasta alcanzar turbidez de 0,5 en la escala de Mac Farland.

Una vez alcanzada la concentración deseada, se tomó 4 mL del cultivo de la cepa receptora con 2 mL de la donadora, se mezclaron estas cantidades en un tubo vacío estéril y se mantuvo a temperatura ambiente y sin agitación por toda la noche.

Para saber el número aproximado de las células donadoras que van a participar en la conjugación, se hace un recuento de donadoras, para lo cual se realizaron diluciones seriadas del cultivo de la cepa donadora, con solución salina, y se trabajó con las últimas diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) tomándose 100 µL de cada una de las tres diluciones y diseminándose sobre Agar BHI con eritromicina. Se incubó a 37°C por toda la noche.

Trascurrido el tiempo, se interrumpió la conjugación mediante agitación en vortex por 30 segundos y se procedió a hacer el recuento de transconjugantes. Para esto se tomó 100 µL del cultivo mixto y se diseminó sobre Agar BHI conteniendo eritromicina (22 µg/mL) y rifampicina (72 µg/mL). Se dejó a temperatura ambiente durante 24 h.

También se realizaron siembras controles, donde los cultivos de las cepas donadoras y receptora fueron sembradas por estrías en placas con

agar BHI conteniendo eritromicina, y también en placas con agar BHI con rifampicina. Las placas se incubaron a 37° C por 24 h.

#### **3.2.4.4 Prueba de conjugación en cepas resistentes a estreptomicina**

Para esta prueba se sembraron las cepas donadoras, resistentes a estreptomicina, en 3 mL de caldo BHI conteniendo 1000 µg/mL de estreptomicina y la cepa receptora se sembró en 3 mL de caldo BHI conteniendo 70 µg/mL de rifampicina y fueron incubados a 37° C por toda la noche y sin aireación. Transcurrido este tiempo, se tomó un inóculo de cada una de las cepas donadoras y se sembró en diferentes tubos conteniendo 4 mL de caldo BHI con 1000 µg/mL de estreptomicina. La cepa receptora se sembró en tubos con 8 mL de caldo BHI conteniendo 70 µg/mL de rifampicina, se mantuvo a temperatura ambiente y con aireación hasta que el cultivo alcanzó una concentración equivalente a 0,5 de la escala de Mac Farland.

Una vez alcanzada la concentración deseada, se tomó 4 mL del cultivo de la cepa receptora con 2 mL de la donadora, se mezclaron estas cantidades en un tubo vacío estéril y se mantuvo a temperatura ambiente y sin agitación por toda la noche.

Para saber el número aproximado de las células donadoras que van a participar en la conjugación se hace un recuento de donadoras, para lo cual se realizaron diluciones seriadas del cultivo de la cepa donadora, con solución salina. Se sembró por diseminación sobre Agar Muller Hinton con

estreptomicina, 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las tres últimas diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) y se dejó incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  por toda la noche.

Transcurrido este tiempo, se interrumpió la conjugación mediante agitación en vortex por 30s y se procedió a hacer el recuento de transconjugantes. Para esto se tomó 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cultivos mixtos y se diseminó sobre Agar BHI conteniendo estreptomicina (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) y rifampicina (70  $\mu\text{g/mL}$ ). Se dejó a temperatura ambiente durante 24 h.

Es importante mencionar que antes de la conjugación se realizaron siembras controles, donde los cultivos de las cepas donadoras y la receptora fueron sembrados por estrías en placas con agar BHI conteniendo estreptomicina, y también en placas con agar BHI con rifampicina. Fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h.

### **3.2.5 Extracción de DNA plasmídico**

La extracción de los plásmidos utilizados en la prueba de transformación, descrita más adelante, se realizó utilizando el *kit* de extracción *Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega). El primer paso es el lisado celular, para lo cual se sembró cada una de las transconjugantes en frascos con 10 mL de caldo BHI y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por toda la noche. Al día siguiente se centrifugó el contenido a 10000 rpm durante 10 minutos y el pellet fue resuspendido en 300 $\mu\text{L}$  de *Cell Resuspensión Solution*. Luego, se adicionó 300  $\mu\text{L}$  de *Cell Lysis Solution* y

se mezcló por inversión (4 veces), cuando estuvo bien mezclado se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se agregó 300µL de *Neutralization Solution* y se mezcló por inversión (4 veces). El lisado fue centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante que contenía el plásmido.

El siguiente paso es la purificación del DNA plasmídico. Para esto, se tomó una minicolumna del *kit* y se fijó en su parte superior a una jeringa de 3 mL , y en la parte inferior se fijó a un tubo vacío estéril de 1,5 mL (Figura 10). Se tomó 1 mL de la Resina del *kit* y se agregó a la jeringa ensamblada a la minicolumna, luego se adicionó el sobrenadante obtenido anteriormente que contenía el plásmido. Con la ayuda de un émbolo, se hizo pasar primero la resina a través de la minicolumna, luego se hizo pasar el sobrenadante. Como el plásmido se encuentra ahora fijado en la minicolumna, se hizo un paso de lavado. Se cambió a un tubo nuevo de 1,5 mL y se adicionó 2 mL de la *Wash Solution* a la jeringa de 3 mL, y con la ayuda del émbolo se pasó a través de la minicolumna. Se separó la jeringa de la minicolumna, pero se dejó el tubo, y se centrífugó a 10000 rpm por dos minutos. Para el último paso que fue la elusión del plásmido, se transfirió la minicolumna a un tubo nuevo de 1,5 mL y se agregó 50 µL de *Nuclease-Free Water* (pretratada a 70°C) a la minicolumna, y se dejó esperar por un minuto. Luego se centrifugó a 10000 rpm durante veinte segundos y después se removió la minicolumna para finalmente guardar el DNA plasmidico a -20 °C.



### 3.2.6 Corrida electroforética de los plásmidos

Para evidenciar la presencia de los plásmidos y observar el tamaño de éstos, los plásmidos extraídos en el paso anterior fueron mezclados con buffer de carga en proporción 1:1 y fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 1%, en buffer TAE 1X, a 80mV. Luego, el gel fue teñido en bromuro de etidio y finalmente observado en un transiluminador con radiación UV (BIOMETRA TI1).

.

### 3.2.7 Prueba de Transformación

Para esta prueba, se trabajó con las cepas que realizaron conjugación y se emplearon dos técnicas de transformación. La primera técnica empleada fue una modificación del método de Pozzi *et al* (1996), realizada en especies del género *Streptococcus*.

Primero se realizó la obtención de la feromona de competencia. Para esto, se sembró la cepa receptora JH2-2 en dos tubos conteniendo 3 mL de caldo TSB y se incubaron a 37°C por toda la noche. Al día siguiente se tomó uno de los tubos, se centrifugó a 12000 rpm durante tres minutos. El *pellet* se resuspendió en caldo TSB hasta obtener la concentración 0,5 en la escala de Mac Farland. Se incubó a 37°C durante 4h. Pasado este tiempo, se centrifugó el cultivo a 7000 rpm durante 20 minutos y se decantó el sobrenadante que contenía la feromona en forma cruda (péptido inductor de la competencia).

Para la prueba de transformación, se tomó 450  $\mu$ L del otro cultivo de la cepa JH2-2 sembrado el día anterior, se sembró en un tubo que contenía 450  $\mu$ L de medio de competencia (TSB [pH8], 10% de glicerol, 0,16 % de seroalbumina bovina, 0,01% de  $\text{CaCl}_2$ ) y se adicionó 100  $\mu$ L de la feromona cruda y 5  $\mu$ g/mL de DNA plasmídico. Se incubó a 37°C durante 180 minutos. Los plásmidos empleados provenían de cada una de las colonias transconjugantes obtenidas en la prueba de conjugación.

La segunda técnica empleada fue la de Yeh *et al* (2002). Para esto se curaron con SDS al 0,003% las cepas donadoras que realizaron conjugación, y fueron utilizadas como receptoras en la prueba de transformación. Se tomó un inóculo de las cepas curadas para ser sembrado en placas conteniendo agar LB con antibiótico y en placas de agar LB sin antibiótico, como prueba control. Después de confirmar la curación, se sembró cada una de las cepas curadas en 3 mL de caldo LB, se dejó a 37°C toda la noche. Pasado este tiempo, se tomó 50  $\mu$ L de este cultivo y se estrió sobre agar Luria sin antibiótico y se incubó por 48 h a 37°C. Luego se las sometió a 4°C por una hora y luego se le adicionó 5  $\mu$ L del plásmido. Se dejó incubando por 6 h a 37°C. Luego se tomaron estas colonias y se resuspendió en 0,5 mL de caldo BHI y se incubó a 37°C hasta obtener 0,5 a la escala de Mac Farland. Los plásmidos empleados fueron extraídos de cada una de las colonias transconjugantes obtenidas en la prueba de conjugación.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Resistencia a antimicrobianos por disco difusión

Se obtuvieron valores de los halos de sensibilidad en milímetros (mm), mostrándonos que un 83,9% de las 31 cepas analizadas exhibieron algún tipo de resistencia a los antibióticos utilizados (Tabla 7, 8).

El 6,5 % de las cepas mostraron resistencia a tetraciclina, el 9,7 % a norfloxacin, el 22,6 % a ciprofloxacina, el 19,3 % a eritromicina, el 9,7 % a penicilina, el 35,5 a rifampicina, el 61,3 % a estreptomicina, el 35,5 % a azitromicina y el 61,3 % a clindamicina. Para los antibióticos vancomicina, levofloxacina y cloramfenicol sólo se observó sensibilidad intermedia. La especie que demostró tener mayor resistencia fue *Enterococcus faecium* (100%), donde todas las estirpes con las que se trabajó mostraron resistencia a un antibiótico como mínimo. El 90,3% de las cepas estudiadas fueron susceptibles a penicilina y vancomicina (Tabla 9).

Las cepas estudiadas expresan 16 diferentes antibiotipos, encontrándose multiresistencia en cepas de las cuatro especies que se han considerado en este estudio. El 55 % de las 31 cepas estudiadas, expresaron resistencia al menos a tres antibióticos diferentes, encontrándose resistencias múltiples de hasta 6 antibióticos. Solamente el 16,1% de las cepas no mostraron algún tipo de resistencia (Tabla 10).

## 4.2 Concentración Mínima de Inhibición (CMI)

Con esta prueba, varias de las cepas que mostraron sensibilidad intermedia, expresaron resistencia a los cuatro antibióticos empleados.

De las doce cepas con sensibilidad intermedia observadas en la prueba de disco difusión para ciprofloxacina, cinco de ellas fueron encontradas resistentes mediante la prueba de la CMI: *E.hirae* 31, *E.durans* 10, *E.durans* 11, *E.faecium* 7 y *E.faecium* 14 (Tabla 11). Con respecto a norfloxacina, de las siete cepas con sensibilidad intermedia frente a este antibiótico, cinco cepas fueron halladas resistentes: *E.durans* 5, *E.hirae* 29, *E.durans*30, *E.durans*32 y *E.faecalis* 43 (Tabla 12). Asimismo, de las siete cepas que mostraron sensibilidad intermedia a estreptomicina, tres fueron encontradas resistentes por el método de la CMI: *E.faecium* 65, *E.hirae* 15 y *E.faecalis* 17 (Tabla 13). Por último, de las quince cepas que presentaron sensibilidad intermedia frente a eritromicina, en la prueba de disco, tres de ellas expresaron resistencia en la prueba de la Concentración Mínima Inhibitoria: *E.faecium* 65, *E.hirae* 15 y *E.faecium* 90 (Tabla 14).

En consecuencia, el número de cepas resistentes a ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina y estreptomicina, aumentó de 7, 3, 6 y 19 cepas a 12, 8, 9 y 22 cepas respectivamente (Tabla 15). Del mismo modo, variaron los porcentajes de resistencia que previamente se habían obtenido con la prueba de disco difusión. De las 31 cepas analizadas, se reportan resistencias a los siguientes antibióticos en el orden que a continuación sigue: estreptomicina 71%; clindamicina 61%; ciprofloxacina, rifampicina y

azitromicina 35% cada uno; norfloxacin y eritromicina 29%; penicilina 10% y tetracilina 6.5% (ver Tabla 16).

Es importante indicar que la prueba de la CMI mostró valores muy altos de resistencia para estreptomina (>2400 µg/mL) y para eritromicina (>240 µg/mL) en algunas de las cepas estudiadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron las cepas para los estudios de transferencia horizontal de genes (Tabla 17), tomándose en cuenta la ausencia de resistencia a rifampicina debido a que la cepa receptora utilizada en este estudio (*E. faecalis* JH2-2) porta este tipo de resistencia. Las cepas seleccionadas fueron sometidas a la prueba de curación de plásmidos.

#### **4.3 Curación de plásmidos**

En la Tabla 18 se establece el porcentaje de SDS que se utilizó en la prueba de curación de plásmido: 0,003% fue la concentración más alta en la cual se manifestó la pérdida de la resistencia al antibiótico.

Todas las cepas resistentes en estudio, luego de haber sido curadas con SDS al 0,003%, exhibieron susceptibilidad hacia los antibióticos a los que previamente mostraron resistencia (Tabla 19).

#### 4.4 CMI en cepas con sensibilidad intermedia a Rifampicina

La CMI realizado a aquellas cepas curadas que presentaban sensibilidad intermedia a rifampicina, nos muestra que estas cepas no son resistentes a este antibiótico (Tabla 20), pudiéndose así seleccionar las cepas que serían utilizadas en la prueba de conjugación (Tabla 21).

#### 4.5 Recuento de transconjugantes

Con respecto al control que se hizo a las cepas donadoras, éstas crecieron en las placas con agar BHI que contenían el antibiótico al cual mostraban resistencia, pero no lo hicieron en la placa con agar que tenía rifampicina. Por el contrario, la cepa receptora JH2-2, no creció en ninguna de las placas que contenía agar BHI con uno de los cuatro antibióticos, pero sí creció en agar con rifampicina.

De las dos cepas seleccionadas para la transferencia de genes con resistencia a norfloxacin ( *E. hirae* 29 y *E. hirae* 15), ninguna mostró colonias transconjugantes. El mismo resultado se tuvo para aquellas especies (*E. hirae* 23, *E. durans* 12 y *E. faecium* 90) seleccionadas para la conjugación de resistencia a ciprofloxacina, donde no se obtuvo colonias transconjugantes.

En la Tabla 22, se puede observar que para el recuento del número de donadoras, en las cepas: *E. faecalis* 17, *E. faecalis*, 18, *E. hirae* 22 (resistentes a estreptomicina) y *E. faecalis* 43 (resistente a eritromicina) se

utilizaron las tres últimas diluciones, obteniéndose:  $45 \times 10^6$ ,  $16 \times 10^7$ ,  $11 \times 10^7$  y  $73 \times 10^6$  colonias respectivamente. Para las otras tres cepas: *E. hirae* 29, *E. durans* 32 y *E. faecium* 89 (con resistencia a estreptomicina) se utilizaron las dos últimas diluciones y se obtuvo:  $82 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$  y  $84 \times 10^7$  respectivamente. Para la especie *E. faecalis* 42 (resistencia a estreptomicina), se hizo el recuento de dos diluciones, teniéndose  $79 \times 10^6$  colonias. El número de donadoras se obtuvo del promedio de las colonias presentes en las diluciones.

De las dos especies elegidas para la conjugación de la resistencia a eritromicina, sólo en una (*E. faecalis* 43) se obtuvo colonias transconjugantes. En relación a las cepas resistentes a estreptomicina, es necesario indicar que se incorporaron siete cepas más para el estudio debido a la alta resistencia mostrada también a este antibiótico. De las 14 cepas resistentes a estreptomicina que se eligieron para la conjugación, se obtuvieron transconjugantes en siete cepas: *E. faecalis* 17, *E. faecalis* 18, *E. hirae* 22, *E. hirae* 29, *E. durans* 32, y *E. faecium* 89 (Tabla 22).

Las transferencias, por conjugación, de la resistencia a estreptomicina y eritromicina a una cepa estándar  $F^-$  (*E. faecalis* JH2-2) mostró frecuencias de transconjugación que van desde  $9 \times 10^{-6}$  hasta  $1 \times 10^{-1}$  siendo este último valor más alto de lo esperado

#### **4.6 Corrida electroforética de los plásmidos**

Como se puede observar en la figura 11, el tamaño de los plásmidos con respecto al marcador es superior. La banda de mayor tamaño en el marcador usado es de 10Kb, informándonos de este modo que los plásmidos presentan un mayor tamaño.

#### **4.7 Prueba de Transformación:**

Para la realización de esta prueba se obtuvo previamente DNA plasmídico de las cepas transconjugantes del estudio.

No se observaron colonias transformantes para alguna de las dos pruebas de transformación realizadas con los plásmidos de las ocho cepas de *Enterococcus* que si mostraron conjugación: *E. faecalis* 17, *E. faecalis* 18, *E. faecalis* 43, *E. hirae* 22, *E. hirae* 29, *E. durans* 32, y *E. faecium* 89



## V. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Las 31 cepas seleccionadas en el presente trabajo, según lo reportado por Suarez (2002), tienen participación en cuadros patológicos humanos. Todas ellas han sido aisladas del mar limeño y han sido previamente identificadas en laboratorio por métodos fenotípicos (Guerrero y Alvarado, 2005). Se trató de seleccionar un número semejante de cepas para cada especie para no influenciar la frecuencia de resistencia expresada en cada una de las 31 cepas.

La selección de los doce antibióticos estuvo basado en trabajos anteriormente reportados donde se muestra una gran resistencia de diferentes especies de *Enterococcus* provenientes de aislados clínicos y ambientales hacia estos antibióticos (Hällgren *et al*, 2001; Fahr *et al*, 2003; Alves d' Azevedo *et al*, 2004; Maschieto *et al*, 2004).

Según los resultados de la prueba por difusión de disco, se ha podido encontrar 19 patrones diferentes de resistencia a antibióticos, observándose patrones de hasta 6 marcadores de resistencia y donde el 55 % de las cepas expresaban resistencia por lo menos a tres de los 12 antibióticos que se utilizaron en la experiencia (Tabla 10), revelando que estos microorganismos no sólo pueden llegar a tener resistencia a diferentes antibióticos, sino que pueden mantenerla aun en condiciones adversas tal como el ambiente marino (Rincé *et al*, 2002; Hayes *et al*, 2004 ).

En el presente trabajo, la resistencia que mayormente presentaron estas especies de *Enterococcus* fue hacia estreptomicina, y varios estudios reportados anteriormente demuestran que diferentes especies de este género; *E. faecium* y *E. faecalis* de origen clínico, se caracterizan por ser resistentes a este antibiótico (Metchock *et al*, 1991; Cercenado *et al*, 1995; Velásquez *et al*, 2002; Fahr *et al*, 2003; Sánchez-Molina *et al*, 2004). Asimismo, a pesar que *E. faecalis* es la especie con el mayor número de aislados en muestras clínicas, se ha reportado repetidas veces que el porcentaje de resistencia de esta especie, proveniente de aislados clínicos y ambientales, es menor que el expresado por *E. faecium* frente a algunos antibióticos como estreptomicina (Rice *et al*, 1995; Hällgren *et al*, 2001; Velásquez *et al*, 2002; Silva *et al*, 2005); otros estudios relatan inclusive, mayores niveles de resistencia a este antibiótico en cepas de *E. faecium* provenientes de muestras ambientales (Jackson *et al*, 2004; Ronconi *et al*, 2004). Se afirma además que la resistencia a glucopéptidos se presenta con mayor frecuencia en esta particular especie de *Enterococcus* (Famiglietti *et al*, 2003).

Del mismo modo, según otros reportes, *Enterococcus durans* y *E. hirae* frecuentemente presentan una menor prevalencia en aislados clínicos o ambientales y generalmente se ha reportado una mayor prevalencia y resistencia de *E. hirae* sobre *E. durans* (Kaufhold *et al*, 1995; Devriese *et al*, 2002; Ronconi *et al*, 2004; Silva *et al*, 2005). En nuestro estudio vemos similares niveles de resistencia entre las dos especies, inclusive *E. durans* presenta un mayor porcentaje de resistencia que *E. hirae*, y aún mas

interesante es observar que estas dos especies expresan multiresistencias en frecuencias más altas que las expresadas por *E. faecalis*.

La alta resistencia a clindamicina observada en este estudio, coincide con otros resultados obtenidos en trabajos anteriores, y puede deberse principalmente a que los *Enterococcus* presentan una resistencia natural o intrínseca a este antibiótico; aunque también se ha reportado la inactivación del antibiótico mediada por plásmido (Bozdogan *et al*, 1999; Guevara *et al*, 2000; Famiglietti *et al*, 2003; Bazet *et al*, 2005).

Se realizó la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria para ciprofloxacina, norfloxacina y eritromicina, debido a su ubicación en plásmidos reportada previamente, y estreptomicina, considerando además la elevada frecuencia de resistencia encontrada entre las cepas de *Enterococcus* del estudio. Los resultados permitieron confirmar los valores de resistencia encontrados para estos antibióticos con la prueba de difusión en disco. Se encontró sensibilidad en muchas de las cepas reportadas como intermedias por la mencionada prueba, pero también se hallaron altos valores de resistencia de hasta 80 µg/mL para ciprofloxacina, >2400 µg/mL para estreptomicina, 40 µg/mL para norfloxacina y >240 µg/mL para eritromicina (ver Tablas 11, 12, 13, 14). Éstos son cercanos o mayores a los valores anteriormente reportados en especies de *Enterococcus* donde se encontraban resistencias superiores a 64 µg/mL para ciprofloxacina, >2000 µg/mL para estreptomicina; > 32 µg/mL para norfloxacina y >256 µg/ml para eritromicina; aunque se encontró en un reporte que una cepa de

*Enterococcus* aislada de muestra ambiental, presentó resistencia a estreptomicina > 16000 µg/mL (Rice *et al*, 1995; Tankovic *et al*, 1996; Aleksandrowicz, 1999; Potillo *et al*, 2000; Maschieto *et al*, 2004; Cho *et al*, 2006; Leavis *et al*, 2006).

A través de las pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que se realizaron frente a los cuatro antibióticos, se pudo conocer que 25 cepas presentaban resistencia hacia cada uno de los antimicrobianos probados. Con estos datos se eligió aquellas especies que presentaban resistencia a al menos uno de los cuatro antibióticos a probar, tratando de no seleccionar aquellas que presenten resistencia a rifampicina ya que es una resistencia cromosómica presente en la cepa receptora que se utilizó para la prueba de conjugación. Así, se pudo determinar que de las 25 cepas resistentes, 11 mostraban resistencia a rifampicina (Tabla 17).

Para la curación de las 14 cepas restantes, se utilizó SDS porque ha mostrado ser muy eficiente en la curación de plásmidos de bacterias Gram-positivas (Sieo *et al*, 2005), y según trabajos reportados en *Enterococcus faecalis* se mostró que estos microorganismos son muy sensibles a este detergente, siendo éste considerado de elección para la curación de plásmidos en cepas de *Enterococcus* (Flahaut *et al*, 1996; Keyhani *et al*, 2005). Inicialmente, se desconocían valores de concentración de SDS para la curación de *Enterococcus*, pero se sabía que para *S. aureus* era de 0,002% (Sonstein & Baldwin, 1972) por lo que se estableció un rango de concentraciones en la prueba inicial de estandarización.

Para la estandarización del porcentaje de SDS que iba a ser utilizado para la curación, es necesario indicar que se hizo una prueba de concentración mínima de inhibición, donde primero se empezó a probar con bajas concentraciones del detergente: ocho diluciones que se encontraban entre el 0,0002 al 0,001% de SDS, pero como todas las cepas crecieron a estas concentraciones, se procedió a hacer otras cinco diluciones que iban desde 0,05 hasta el 1% de SDS. Ninguna de las cepas creció a estas concentraciones por lo que fue necesario realizar un último grupo de diluciones que iba desde 0,0015 hasta 0,005%, observándose que la posible concentración para la curación oscilaba entre 0,002 – 0,004 %. (Tabla 18). Por tal motivo, la concentración de 0,003% se determinó como promedio para el género *Enterococcus*. Un resultado similar se obtuvo en un estudio realizado por De Kwaadsteniet *et al* (2006), donde el SDS fue utilizado como un agente adecuado para la curación de plásmidos en *Enterococcus*.

Las catorce cepas que perdieron la resistencia fueron interpretadas como portadoras de resistencia plasmídica a los determinados antibióticos y fueron seleccionadas para las pruebas de transferencia por conjugación, pero dentro de este grupo, indicamos también que hubieron cuatro cepas que inicialmente presentaban sensibilidad intermedia a rifampicina, por lo que fue necesario hacerles un MIC para este antibiótico, descartando esa resistencia (Tabla 19, 20).

Una vez observadas las resistencias de las 14 cepas, se tomó un grupo con diferentes cepas para cada antibiótico. La elección de estas cepas

se realizó de acuerdo al grado de resistencia que mostraron a un determinado antibiótico en la prueba de disco difusión y concentración mínima de inhibición. De este modo, se trabajó con dos cepas (*E.hirae* 15 y *E.hirae* 29) para norfloxacin; tres cepas (*E. durans* 12, *E. faecium* 90 y *E.hirae* 23) para ciprofloxacina; dos cepas (*E. faecalis* 42 y *E. faecalis* 43) para eritromicina y siete cepas (*E. durans* 11, *E. durans* 28, *E. durans* 32, *E. faecium* 89, *E. faecalis* 17, *E. faecalis* 18 y *E .hirae* 22) para estreptomycin (Tabla 21).

Como se mencionó previamente en los resultados, no hubo conjugación de las cepas resistentes a norfloxacin y ciprofloxacina, pero si hubo conjugación de una cepa resistente a eritromicina (*E.faecalis* 43), la cual mostró alto índice de conjugación. De las siete cepas elegidas para estreptomycin, conjugaron sólo cinco: *E. durans* 32, *E. faecium* 89, *E .faecalis* 17, *E. faecalis* 18 y *E. hirae* 22, observándose elevados índices de conjugación que llegan hasta  $3 \times 10^{-2}$  (Tabla 22). Como se observó que las demás cepas (utilizadas para la conjugación con los otros antibióticos) también eran resistentes a estreptomycin y era muy notorio los valores de resistencia y curación para este antibiótico, se procedió a utilizar las siete cepas restantes para una segunda prueba de conjugación de resistencia a estreptomycin. De estas 7 cepas, sólo dos cepas realizaron la conjugación: *E. hirae* 29 y *E. faecalis* 42. Por lo tanto, finalmente tenemos siete cepas resistentes a estreptomycin, y una cepa resistente a eritromicina que completaron la conjugación.

Las frecuencias de transferencia de plásmidos con resistencia a eritromicina que se han reportado en estudios de conjugación en *Enterococcus* han sido de  $3.1 \times 10^{-5}$  a  $4.7 \times 10^{-4}$  transconjugantes por donadora (Maniatis *et al*, 2001), y de  $9.7 \times 10^{-5}$  a  $5.2 \times 10^{-3}$  para plásmidos con resistencia a estreptomicina (Pournaras *et al*, 2000). En este trabajo el índice de conjugación para plásmidos con resistencia a eritromicina fue de  $1 \times 10^{-1}$ , y de  $9 \times 10^{-6}$  hasta  $3 \times 10^{-2}$  para la resistencia a estreptomicina. Los resultados obtenidos permiten afirmar la elevada capacidad de transferencia de información genética por conjugación de los *Enterococcus spp.* marinos.

Con respecto al tamaño de los plásmidos, estos son superiores a 10kb. Esto ya se había observado en trabajos realizados anteriormente (Flannagan *et al*, 2003) donde se encontraron plásmidos conjugativos con resistencia a eritromicina de un tamaño de 45kb y otro con resistencia a eritromicina y estreptomicina de 95kb de tamaño. En otro estudio (Choho G *et al*, 2007) se reportó la presencia de un plásmido con resistencia a ciprofloxacina, cuyo tamaño era de 40kb. Se puede decir que *Enterococcus* posee plásmidos con resistencia a antibióticos de gran tamaño, inclusive en un estudio realizado por Pasman *et al* (2005) se encontró plásmidos con resistencia a aminoglicósidos que variaban de 150-200kb.

El no haber obtenido transconjugantes en las cepas resistentes a ciprofloxacina, norfloxacina y algunas con resistencia a eritromicina y estreptomicina, posiblemente sea por el gran tamaño de los plásmidos pero hay que tomar en cuenta que los plásmidos con resistencia a antibióticos

mencionados anteriormente, son de gran tamaño pero son plásmidos conjugativos. Por lo tanto, la razón de que no haya habido conjugación en determinadas cepas, en el presente estudio, puede ser debido a que éstas presentan plásmidos de resistencia pero no conjugativos.

El no haber obtenido colonias transformantes se deba posiblemente a que estos microorganismos no transfieran fácilmente sus plásmidos mediante transformación. Al mismo tiempo, a pesar de que se asevera que estos microorganismos poseen una competencia natural, son muy escasos los reportes de una transformación natural de *Enterococcus* donde no se haya utilizado estimuladores u otros métodos de transformación lejana a las condiciones casi naturales que se quiso dar a los enterococos en este estudio. Muchos de los estudios de transformación, en condiciones de laboratorio, reportados en el género *Enterococcus*, se han realizado con técnicas de electroporación, y en *Streptococcus* han sido realizados mediante la obtención de protoplastos o empleando el péptido estimulador de la competencia (CSP) sintetizado, purificado o adquirido de forma sintética (Friesenegger, *et al*, 1991; Havarstein *et al*, 1995; Li *et al*, 2001), por lo que podemos entender que no resulta fácil conseguir una transformación natural de este género en condiciones de laboratorio.

Asimismo, en estudio realizado por Signoretto *et al* (2000) se observó que cepas de *Enterococcus* expuestas a ambientes acuáticos adoptaban un estado viable no cultivable (VBNC) y se adecuaban a las condiciones ambientales en particular por medio de cambios en la composición de su



pared celular, estos microorganismos engrosaban su pared y gracias a esto se mantenían vivos en estas condiciones. Este dato es muy importante y debe ser considerado ya que si los *Enterococcus* que se encuentran en el mar mantienen este estado para su supervivencia, la transformación no sería el modo de transferencia genética horizontal que utilicen para transferir plásmidos de resistencia en el ambiente marino.

## VI. CONCLUSIONES

1. Las cuatro especies del género *Enterococcus*: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* y *E. durans*, provenientes de muestras de aguas del mar limeño, presentan resistencia a la mayoría de los 12 antimicrobianos utilizados, principalmente a estreptomicina y clindamicina.
2. La resistencia a antibióticos presente en las cepas de *Enterococcus*, es debida a muchos factores, uno de ellas es la presencia de plásmidos y eso se pudo comprobar en el presente estudio mediante la curación de cepas resistentes con SDS.
3. A diferencia de la conjugación, la transformación no fue un modo de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos, empleado en las cepas de *Enterococcus* utilizadas en el presente trabajo.
4. Se concluye que las especies de *Enterococcus* de origen marino que han sido utilizados en el presente estudio, consideradas patógenas para el hombre y los animales, presentan resistencias a antibióticos de uso clínico, los cuales son transferibles por conjugación en condiciones de laboratorio.

## VII. CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS FINALES

En la ciudad de Lima, el litoral marino sufre un fuerte impacto de origen antrópico debido a las grandes descargas de los desagües, sin tratamiento previo. De este modo, estos efluentes transportan microorganismos intestinales, como los pertenecientes al género *Enterococcus*, hacia el ambiente marino, portando consigo información genética de resistencia a antibióticos, pudiendo éstos ser transferidos horizontalmente a la flora autóctona y alóctona de las zonas costeras, permitiendo de esta manera el mantenimiento de esta información en el ambiente, que luego puede ser introducida a la población humana a través del consumo de productos hidrobiológicos. Por este motivo, y porque *Enterococcus* es considerado un indicador ideal de contaminación fecal en ambientes marinos, fue importante el estudio de este microorganismo.

Los resultados del presente trabajo nos permite afirmar, que en las aguas costeras de Lima se encuentran *Enterococcus* spp. asociados a enfermedades humanas, que poseen plásmidos y posiblemente también otros elementos transferibles con información genética para la resistencia a antibióticos, los que pueden ser transmitidos de modo horizontal a otros microorganismos con los cuales comparten el hábitat.

Las resistencias observadas para *Enterococcus* spp de ambientes marinos permiten presumir la importancia de este patógeno oportunista en el ecosistema, en especial si consideramos que las especies estudiadas están

asociadas a infecciones humanas y por la enorme capacidad reportada para la transferencia genética de esta información, principalmente por conjugación a otros organismos.

El estudio de *Enterococcus* sigue siendo una necesidad debido a que es causante, de manera cada vez más incrementada, de infecciones intra hospitalarias oportunistas, muchas de ellas provocadas por cepas multiresistentes, cuya transferencia, puede realizarse con mucha facilidad en los ambientes intrahospitalarios o también puede involucrar la participación de reservorios ambientales que pueden diseminarse de manera inaparente en la naturaleza.

Un estudio mas profundo de la resistencia antimicrobiana de *Enterococcus*, y una evaluación amplia de su potencial en la transferencia de estos marcadores en la naturaleza, nos permitiría entender la epidemiología de la transmisión de éstos caracteres en nuestro medio.

Se hace necesario determinar el origen de los enterococos presentes en columnas de agua y establecer con claridad la prevalencia de *Enterococcus* spp. provenientes de animales que habitan espacios costeros. A pesar de la importancia que esta bacteria viene ganando en los últimos años, en nuestro medio es poco el estudio que determine la diversidad de este género en ambientes marinos y menos aún sus relaciones con especies patogénicas. Es importante destacar que al investigar la diversidad específica de *Enterococcus* en estos ambientes, se estaría determinando

también que especies son las que prevalecen en nuestro medio (de origen humano o animal) y si éstas mantienen características que signifiquen algún riesgo para la salud humana.

El presente estudio analizó los mecanismos de transferencia genética conjugativa y por transformación de cepas seleccionadas de origen marino determinando las frecuencias en que son transferidos marcadores de resistencia a antibióticos a cepas estándar.

Esta persistencia de *Enterococcus* spp en el ambiente natural lleva a la necesidad de establecer diferencias entre los linajes ambientales y los que se diseminan en ambientes clínicos utilizando métodos moleculares, lo cual nos permitiría entender los mecanismos de adaptación del microorganismo en condiciones no favorables.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Aleksandrowicz J. 1999.** Drug resistance of *Enterococcus* species isolated from the urogenital system. *Med Dosw Mikrobiol.* 51(3-4): 233-8.

**Alves d'Azevedo P, Gomes C, Krebs S, Ferreira J, Martins L. 2004.** Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology.* 35:199-204.

**Anderson K, Whitlock J, Harwood V. 2005.** Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology.* 71(6): 3041–3048.

**Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin.Pathol.* 45(4): 493-496.

**Bazet C, Blanco J, Seija V, Palacio R. 2005.** Enterococos resistentes a vancomicina. Un problema emergente en Uruguay. *Rev Med Uruguay.* 21: 151-158

**Blanch AR, Caplin JL, Iversen I, Kühn I, Manero A. 2003.** Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *J Appl Microbiol.* 94: 994-1002

**Borrego JJ, Figueras MJ.** 1997. Microbiological quality of natural waters. Microbiol. 13: 413–426.

**Bozdogan B, Berrezouga L, Kuo MS, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, Leclercq R.** 1999. A New Resistance Gene, *linB*, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. Antimicrob Agents Chemother. 43(4): 925–929

**Calderón-Jaimes E, Arredondo-García JL, Aguilar-Ituarte F, García-Roca P.** 2003. In vitro antimicrobial susceptibility in clinical isolates of *Enterococcus* species. Salud pública de México. 45(2): 96-101.

**Cercenado E, Ünal S, Eliopoulos CT, Rubin LG, Isenberg HD, Moellering RC, Eliopoulos GM.** 1995. Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus durans*. J.Antimicrob.Chemother. 36: 821-825.

**Clark N, Olsvik Ø, Swenson JM, Spiegel CA, Tenover FC.** 1999. Detection of a Streptomycin/Spectinomycin Adenylyltransferase Gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43(1): 157-160.

**Cho JK, Kim KS, Lee YJ, Park CK, Kwak DM, Kim AR, Kang MS, Kim JW, Kim BH, Ku BK.** 2006. Alteration in *gyrA* and *parC* Gene Associated

with Fluoroquinolone Resistance of *Enterococcus spp.* Isolated from Feces of Chicken. *Bacteriol Virol.* 36(2): 73-78.

**Chrystal J. 2002.** Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus spp.* Rev Chil Infect . 19 (2): 111-115.

**Chin SC, Abdullah N, Siang TW, Wan HY. 2005.** Plasmid profiling and curing of *Lactobacillus* strains isolated from the gastrointestinal tract of chicken. J Microbiol. 43(3): 251-256.

**Choho G, Abriouel H, Ben N, Lucas R, Ortega E, Martínez-Cañamero M, Laglaoui A, Barrijal S, Gálvez A. 2007.** Characterization of a bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecalis* from cow's milk used in the production of Moroccan traditional dairy foods. Journal of Microbiology and Biotechnology. 24(7): 997-1001.

**Clewell DB, An FY, White BA, Gawron-Burke C. 1985.** *Streptococcus faecalis* Sex Pheromone (cAM373) Also Produced by *Staphylococcus aureus* and Identification of a Conjugative Transposon (Tn918). J Bacteriol. 162(3): 1212-1220.

**Clewell DB, Francia MV, Flannagan SE, An FY. 2002.** Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. Plasmid. 48(3): 193-201.



**Clewell DB, Yagi Y, Dunny GM, Schultz SK.** 1974. Characterization of Three Plasmid Deoxyribonucleic Acid Molecules in a Strain of *Streptococcus faecalis*: Identification of a Plasmid Determining Erythromycin Resistance. J Bacteriol. 117(1): 283–289.

**Consejo Nacional del Ambiente (CONAM).** 2000. Informe Nacional sobre el estado del ambiente. GEO PERU 2000.

**Davidson, Jr, Blevins W, Feary T.** 1996. Interspecies Transformation of Streptomycin Resistance in Oral Streptococci. Antimicrob Agents Chemother. 9(1): 145–150.

**Davies C, Long J, Donald M, Ashbolt N.** 1995. Survival of Fecal Microorganisms in Marine and Freshwater Sediments. Applied and Environmental Microbiology. 61(5): 1888–1896.

**De Kwaadsteniet M, Fraser T, Van Reenen CA, Dicks LMT.** 2006. Bacteriocin T8, a Novel Class IIa sec-Dependent Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* T8, Isolated from Vaginal Secretions of Children Infected with Human Immunodeficiency Virus. Appl Environ Microbiol. 72(7): 4761–4766.

**Devriese LA, Vancanneyt M, Descheemaeker P, Baele M, Van Landuyt HW, Gordts B, Butaye P, Swings J, Haesebrouck F.** 2002. Differentiation

and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. Journal of Applied Microbiology. 92 (5): 821–827.

**Doucet-Populaire F, Trieu-Cuot P, Andremont A, Courvalin P.** 1992. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 502-504.

**Dzidic S, Bedekovic' V.** 2003. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria<sup>1</sup>. Acta Pharmacol Sin. 24 (6): 519-526.

**Eaton T and Gasson J.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and Environmental Microbiology. 67(4): 1628–1635

**Fahr AM, Eigner U, Armbrust M, Caganic A, Dettori G, Chezzi C, Bertoncini L, Benecchi M, Menozzi MG.** 2003. Two-Center Collaborative Evaluation of the Performance of the BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. Clin Microbiol. 41(3): 1135–1142.

**Famiglietti A, Quinteros M, Predari SC.** 2003. Consenso sobre las Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos en Cocos Grampositivos. Revista Argentina de Microbiología. 35: 29-40.

**Ferreira da Silva M, Tiago I, Veríssimo A, Boaventura RAR, Nunes OC, and Manaia CM.** 2005. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol.* 55(2): 322-329.

**Flahaut S, Frere J, Boutibonnes P, Auffray Y.** 1996. Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2416-2420.

**Flannagan SE, Chow JW, Donabedian SM, Brown WJ, Perri MB, Zervos MJ, Ozawa Y, Clewell DB.** 2003. Plasmid Content of a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolate from a Patient Also Colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(12): 3954–3959.

**Friesenegger A, Fiedler S, Devriese LA, Wirth R.** 1991. Genetic transformation of various species of *Enterococcus* by electroporation. *Microbiol Lett.* 63(2-3):323-7.

**Garcia-Vallve S, Romeu A, and Palau J.** 2000. Horizontal Gene Transfer in Bacterial and Archaeal Complete Genomes. *Genome Res.* 10: 1719-1725 .

**Gerardt P, Murria R, Wood W, Krieg N.** 1994. Methods for molecular bacteriology. ASM. Washington, EUA. pp791.

**Guevara Duncan J, Cáceres A , Valencia E.** 2000. Significado Clínico de la Presencia de *Enterococcus* en Secreción Vaginal. Anales de la Facultad de Medicina-UNMSM. 61(3).

**Guerrero AM, Alvarado DE.** 2005. Estudio de la diversidad de *Enterococcus* en áreas costeras de Lima. Libro de Resúmenes del XIV Reunión Científica ICBAR. Lima Perú.

**Haack BJ, Andrews, RE Jr, Loynachan TE** .1993. Isolation of *Enterococcus faecalis* exhibiting conjugal tetracycline from swine lot outflow, in Biotechnology risk assessment:USEPA/USDA/Environment Canada, College Park, ML. University of Maryland Biotechnology Institute.

**Hällgren A, Abednazari H, Ekdahl C, Hanberger H, Nilsson M, Samuelsson A, Svensson E, Nilsson LE.** 2001. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. J Antimicrob Chemother. 48(1):53-62

**Hancock LE, Gilmore MS.** 2000. Pathogenicity of Enterococci. ASM Publications.

**Harwood V.J., Delahoya N.C., Ulrich R.M., Kramer M.F., Whitlock J.E., Garey J.R, Lim D.V.** 2004. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. Microbiol Lett. (7)476-482.

**Hasman H, Villadsen AG, Aarestrup.** 2005. Diversity and Stability of Plasmids from Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium* (GRE) Isolated from Pigs in Denmark. FM. Microbial Drug Resistance. 11(2): 178-184.

**Havarstein L, Coomaraswamy G, Morrison D.** 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Proc.Natl.Acad.Sci.U S A. 92(24):11140-11144.

**Hayes J, English L, Carr L, Wagner D, Joseph S.** 2004. Multiple-Antibiotic Resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from Commercial Poultry Production Environments. Applied and Environmental Microbiology. 70(10): 6005–6011.

**Hespell RB, Whitehead TR.** 1991. Introduction of Tn916 and pAMP1 into *Streptococcus bovis* JB1 by Conjugation. Applied and Environmental Microbiology. 57( 9 ): 2710-2713.

**Huapaya, R. 1995** Resistencia múltiple de entéricos oportunistas mediadas por plásmidos en quemados nosocomiales Tesis para optar título de Biólogo. Fac. Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima. Perú. 66 pp.

**Huycke M, Sahm D, Gilmore MS.** 1998. Multiple-Drug Resistant Enterococci: The Nature of the Problem and an Agenda for the Future. *Emerging Infectious Diseases*. 4(2): 239-249.

**Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J.** 2004. Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates from Food. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3): 1555–1562.

**Iversen A, Kühn I, Rahman M, Franklin A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, Torell E, Möllby R.** 2004. Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environmental Microbiology*. 6(1):55–59.

**Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, Ladely SR.** 2004. Genetic Relatedness of High-Level Aminoglycoside-Resistant Enterococci Isolated from Poultry Carcasses. *Avian Diseases*. 48(1): 100–107.

**Jett B, Huycke M, Gilmore M.** 1994. Virulence of Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 7(4): 462-478

**Kaufhold A, Klein R.** 1995. Species identification and antibiotic susceptibility of enterococci isolated from clinical specimens of hospitalized patients. 282(4): 507-518.

**Keyhani J, Keyhani E, Attar F, Haddadi A.** 2005. Sensitivity to detergents and plasmid curing in *Enterococcus faecalis*. J Ind Microbiol Biotechnol. 33(3): 238-42.

**Kühn I, Iversen A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, Franklin A, Finn M, Aarestrup F, Mette Seyfarth A, Blanch AR, Vilanova X, Taylor HD, Caplin JL, Manero MA, Dominguez L, Herrero IA, Möllby R.** 2003 Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. International journal of food microbiology. 88 (2-3): 133-145.

**Kurenbach B, Bohn C, Prabhu J, Abudukerim M, Szewzyk U, Grohmann E.** 2003. Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its tra region. Plasmid. 50(1): 86-93.

**Leavis HL, Willems RJ, Top J, Spalburg E, Mascini EM, Fluit AC, Hoepelman A, de Neeling AJ, Bonten MJ.** 2003. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. Emerg Infect Dis. 9(9):1108-1115

**Leavis HL, Willems RJ, Top J, Bonten MJ.** 2006. High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. Journal of Clinical Microbiology. 44(3): 1059-1064.

**LeBlanc D, Hawley R, Lee L, Martin E.** 1978. "Conjugal" Transfer of Plasmid DNA among Oral Streptococci. PNAS. 75(7):3484-3487.

**Leonard C, Ranhand J, Cole R.** 1970. Competence factor production in chemically defined media by noncompetent cells of group H *Streptococcus* strain Challis. J Bacteriol. 104(2): 674–683.

**Li Y, Lau P, Lee J, Ellen R, Cvitkovitch D.** 2001. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. Journal of Bacteriology. 183(3): 8 97-908.

**Lleo MM, Bonato B, Benedetti D, Canepari P.** 2005. Survival of enterococcal species in aquatic environments. FEMS Microbiology Ecology. 54: 189–196.

**Lorenz MG, Wackernagel W.** 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol. Rev. 58(3): 563-602.

**Manero A, Blanch A.** 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. Applied and Environmental Microbiology. 65 (10): 4425-4430.

**Marcinek H, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A, Gauer M.** 1998. *Enterococcus faecalis* Gene Transfer under Natural Conditions in Municipal Sewage Water Treatment Plants. Appl Environ Microbiol. 4(2) : 626-632.



**Maniatis A, Pournaras S, Kanellopoulou M, Kontos F, Dimitroulia E, Papafrangas E, Tsakris A.** 2001. Dissemination of clonally unrelated erythromycin- and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a tertiary Greek hospital. Journal of clinical microbiology. 39(12): 4571-4574.

**Maschieto A, Martinez R, Vanzato I, Da Costa A.** 2004 . Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* sp. Isolated from the Intestinal Tract of Patients from a University Hospital in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 99(7):763-767.

**Mella S, Sepúlveda M, Acosta P, Bello H, Domínguez M, González, Zemelman R, Cofré O.** 2002. Aislamiento de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina con genotipo vanB en el Hospital Clínico Regional de Concepción. Rev Chil Infect. 19 (1): 32-36.

**Moat A, Foster J, Spector M.** 2002. Microbial Physiology. Wiley-Liss Inc.pp116-120.

**Moore DF, Zhouwandai MH, Ferguson DM, McGee C, Mott JB, Stewart JC.** 2006. Comparison of 16S rRNA sequencing with conventional and commercial phenotypic techniques for identification of enterococci from the marine environment. J Appl Microbiol. 100(6): 1272-81.

**Murray BE.** 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases*. 4(1): 37-47.

**Noble RT1, Lee IM, Schiff KC.** 2004. Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 464–472.

**Noblea RT, Mooreb DF, Leecasterc MK, McGeed CD, Weisberg SB.** 2003. Comparison of total coliform, fecal coliform, and *Enterococcus* bacterial indicator response for ocean recreational waterquality testing. *Water Res*. 37(7):1637-43.

**Novais N, Coque TM, Ferreira H, Sousa JC, Peixe L.** 2005. Environmental Contamination with Vancomycin-Resistant Enterococci from Hospital Sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6): 3364-3368.

**Organización Panamericana de la Salud (OPS).** 2005. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos -2004-. Reunión Anual de la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos

**Palavecino E.** 2001. Puesta al día en enterococos - año 2001: Identificación de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. *Rev Chil Infect*. 18 (2): 95-100.

**Petersen A, Dalsgaard A.** 2003. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus spp*, isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environ Microbiol.* 5(5): 395-402.

**Pillar CM, Gilmore MS.** 2004. Enterococcal virulence-pathogenicity island of *E. faecalis*. *Frontiers in Bioscience.* 9: 2335-2346.

**Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C.** 2000. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus spp*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(4): 967–971.

**Pournaras S, Tsakris A, Palepou MF, Papa A, Douboyas J, Antoniadis A, Woodford N.** 2000. Pheromone responses and high-level aminoglycoside resistance of conjugative plasmids of *Enterococcus faecalis* from Greece. *J.Antimicrob.Chemother.* 46: 1013-1016.

**Pozzi G., Masala L, Iannelli F, Manganelli R, Havarstein L, Piccoli R, Simon D, Morrison D.** 1996. Competence for Genetic Transformation in Encapsulated Strains of *Streptococcus pneumoniae*: Two Allelic Variants of the Peptide Pheromone. *Journal of Bacteriology.* 178(20):6087–6090.

**Rice L, Carias L.** 1998. Transfer of Tn5385, a Composite, Multiresistance Chromosomal Element from *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 180(3):714-721.

**Rince A, Uguen M, Le Breton Y, Giard JC, Flahaut S, Dufour A, Auffray Y.** 2002. The *Enterococcus faecalis* gene encoding the novel general stress protein Gsp62. Microbiology. 148: 703-711.

**Ronconi MC, Merino LA.** 2000. Enterococos: Identificación y susceptibilidad antimicrobiana. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.

**Raycroft RE, Zimmerman LN.** 1964. New mode of genetic transfer in *Streptococcus faecalis* var. Liquefaciens. J Bacteriol. 87(4): 799–801.

**Sánchez-Molina MI., Martín D, Valladares C.** 2004 Sensibilidad del género *Enterococcus* a diferentes antimicrobianos. Rev. Esp Quimioterap.17(2):184-188.

**Schleifer KH, Kilpper-Balz R.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int J System Bacteriol. 34: 31-4.

**Schlievert P, Gahr P, Assimacopoulos A, Dinges M, Stoehr J, Harmala J, Hirt H, Dunny G.** 1998. Aggregation and Binding Substances Enhance Pathogenicity in Rabbit Models of *Enterococcus faecalis* Endocarditis. Infect Immun. 66(1): 218–223.

**Signoretto C, Burlacchini G, Lleò M, Pruzzo C, Zampini M, Pane L, Franzini G, and Canepari P.** 2004. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the Nonculturable State to Plankton Is the Main Mechanism Responsible for Persistence of This Bacterium in both Lake and Seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(11): 6892-6896.

**Signoretto C, Burlacchini G, Pruzzo C, Canepari P.** 2005. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(5): 2756–2761.

**Signoretto C, Lleo MM , Tafi MC, Canepari P.** 2000. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Applied and environmental microbiology*. 66(5): 1953–1959.

**Sepúlveda M, Bello H, Ruiz M, Hormazábal J, Domínguez M, González G, Mella S, Zemelman R.** 2002. Metodología clásica y molecular en la identificación de especies de *Enterococcus spp.* *Rev. méd. Chile*. 130(1): 45-49.

**Silva J, Loyola P, Galleguillos J, Rodríguez Y, Colque-Navarro P, Möllby R, Kühn I.** 2005. Prevalencia de Enterococos resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Rev. méd. Chile*. 133(10): 1201-1210.

**Simjee S, Fraise AP, Gill MJ.** 1999. Plasmid heterogeneity and identification of a Tn5281-like element in clinical isolates of high-level gentamicin-resistant

*Enterococcus faecium* isolated in the UK. J. Antimicrob. Chemother. 43: 625-635.

**Simjee S, White DG, Wagner DD, Meng J, Qaiyumi S, Zhao S, McDermott PF.** 2002. Identification of vat(E) in *Enterococcus faecalis* Isolates from Retail Poultry and Its Transferability to *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3823-3828.

**Sonstein SA, Baldwin JN.** 1972. Loss of the Penicillinase Plasmid After Treatment of *Staphylococcus aureus* with Sodium Dodecyl Sulfate. J Bacteriol. 109(1): 262–265.

**Suárez M.** 2002. Tendencia actual del estreptococo como indicador de contaminación fecal. Rev Cubana Hig Epidemiol. 40(1): 38-43.

**Tait-Kamradt A, Davies T, Cronan M, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sutcliffe J.** 2000. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. Antimicrob Agents Chemother. 4(8): 2118-25.

**Tankovic J, Mahjoubi F, Courvalin F, Duval J, Leclercq R.** 1996. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase gyrA Gene. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 40(11): 2558–2561.

**Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N.** 2003. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 60: 001–015.

**Torres C, Reguera JA, San Martín MJ, Pérez-Díaz JC, Baquero F.** 1994. vanA-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus spp* in sewage. *J Antimicrob Chemother.* 33: 553-61.

**Tran JH, Jacoby GA.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(8): 5638-42.

**Trieu-Cuot P, Carlier C, Courvalin P.** 1988. Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 170(9):4388-91.

**Trzciniński K, Thompson CM, Lipsitch M.** 2004. Single-Step Capsular Transformation and Acquisition of Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology.* 186(11): 3447–3452.

**Turbow DJ, Osgood ND, Jiang SN.** 2003. Evaluation of recreational health risk in coastal waters based on *Enterococcus* densities and bathing Patterns. *Environmental Health Perspectives.* 111(4): 598-603.

**Velásquez J, Lizaraso1F, Zetola N, Pamno O, Sánchez L, Wong W, Hernández R.** 2002. Vigilancia de la resistencia de *Enterococcus sp.* a la vigilancia y evaluación *in vitro* de nuevas alternativas terapéuticas. 15(2).

**Wheeler A, Hartel P, Godfrey D, Hill J, Segars W.** 2002. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. J. Environ. Qual. 31: 1286–1293.

**Wirth R, An FY, Clewell DB.** 1986. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. J Bacteriol. 165(3): 831-6.

**Yeh YC, Chang KC, Yang JC, Fang CT, Wang JT.** 2002. Association of Metronidazole Resistance and Natural Competence in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 46(5): 1564–1567.

**Zumarán C.** 1996. Calidad del Agua: Problemática en el Perú. Agua y Riego. 6(6).



## IX. ANEXOS

### 9.1 TABLAS

**Tabla 1. Cepas utilizadas en el presente estudio.**

<b>Especie</b>	<b>Nº</b>	<b>Cepa</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	Cepa de referencia
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2	1	Cepa de referencia
<i>Enterococcus durans</i> , origen marino	9	Ed2; Ed4; Ed5; Ed10; Ed11; Ed12; Ed28; Ed30; Ed32
<i>Enterococcus faecium</i> , origen marino	8	Efm7; Efm13; Efm14; Efm65; Efm66; Efm70; Efm89; Efm90
<i>Enterococcus faecalis</i> , origen marino	6	Efs17; Efs18; Efs26; Efs27; Efs42; Efs43
<i>Enterococcus hirae</i> , origen marino	8	Eh8; Eh15; Eh20; Eh22; Eh23; Eh29; Eh31; Eh40

**Tabla 2. Antibióticos empleados.**

<b>Antibiótico</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Concentración en disco</b>
Azitromicina	AZT	15 µg
Clindamicina	Da	2 µg
Clorafenicol	C	30 µg
Ciprofloxacina	CIP	5 µg
Eritromicina	EM	15 µg
Estreptomicina	S	300 µg
Levofloxacina	LVX	5 µg
Norfloxacina	NOR	10 µg
Penicilina	P	10 µg
Rifampicina	R	15 µg
Tetraciclina	Te	30 µg
Vancomicina	VA	30 µg

**Tabla 3. Preparación de las diluciones de Ciprofloxacina**

Paso	[ ] inicial	Fuente	Vol	Agua	[ ]intermedia	[ ] final	en µg/ml
1	12.8mg/ml	stock	-	-	12.8mg/mL	0.32 mg/mL	320
2	12.8mg/ml	Paso1	1	1	6.4 mg/mL	0.16 mg/mL	160
3	12.8mg/ml	Paso1	1	3	3.2 mg/mL	0.08 mg/mL	80
4	3.2 mg/ml	Paso3	1	1	1.6 mg/mL	0.04 mg/mL	40
5	3.2 mg/ml	Paso3	1	3	0.8 mg/mL	0.02 mg/mL	20
6	3.2 mg/ml	Paso3	1	7	0.4 mg/mL	0.01 mg/mL	10
7	0.4 mg/ml	Paso6	1	1	0.2 mg/mL	0.005mg/mL	5
8	0.4 mg/ml	Paso6	1	3	0.1 mg/mL	0.0025 mg/mL	2.5
9	0.4 mg/ml	Paso6	1	7	0.05 mg/mL	0.00125mg/mL	1.25

\*Se tomó 0,5 mL de la concentración intermedia para un volumen final de 20 nL de agar LB.

**Tabla 4. Preparación de las diluciones de Norfloxacin.**

Paso	[ ] inicial	Fuente	Vol	Agua	[ ]intermedia	[ ] final	en µg/ml
1	3,2 mg/mL	Paso1	1	3	3,2 mg/mL	0,08 mg/mL	80
2	3,2 mg/mL	Paso3	1	1	1,6 mg/mL	0,04 mg/mL	40
3	3,2 mg/mL	Paso3	1	3	0,8 mg/mL	0,02 mg/mL	20
4	3,2 mg/mL	Paso3	1	7	0,4 mg/mL	0,01 mg/mL	10
5	0,4 mg/mL	Paso6	1	1	0,2 mg/mL	0,005mg/mL	5
6	0,4 mg/mL	Paso6	1	3	0,1 mg/mL	0,0025 mg/mL	2,5
7	0,4 mg/mL	Paso6	1	7	0,05 mg/mL	0,00125 mg/mL	1,25

\*Se tomó 0,5 mL de la concentración intermedia para un volumen final de 20 nL de agar LB.

**Tabla 5. Preparación de las diluciones de Estreptomicina.**

Paso	[ ] inicial	Fuente	Vol	Agua	[ ]intermedia	[ ] final	en µg/ml
1	96 mg/mL	stok	-	-	96 mg/mL	2,4 mg/mL	2400
2	96 mg/mL	Paso1	1	1	48 mg/mL	1,2 mg/mL	1200
3	96 mg/mL	Paso1	1	3	24 mg/mL	0,6 mg/mL	600
4	24 mg/mL	Paso3	1	1	12 mg/mL	0,3 mg/mL	300
5	24 mg/mL	Paso3	1	3	6 mg/mL	0,15 mg/mL	150
6	24 mg/mL	Paso3	1	7	3 mg/mL	0,075 mg/mL	75
7	3 mg/mL	Paso6	1	1	1,5 mg/mL	0,0375 mg/mL	37,5

\*Se tomó 0,5 mL de la concentración intermedia para un volumen final de 20 mL de agar LB.

**Tabla 6. Preparación de las diluciones de Eritromicina.**

Paso	[ ] inicial	Fuente	Vol	Agua	[ ]intermedia	[ ] final	en µg/mL
1	96 mg/mL	stok	-	-	9,6 mg/mL	0,24 mg/mL	240
2	96 mg/mL	Paso1	1	1	48 mg/mL	1,2 mg/mL	120
3	96 mg/mL	Paso1	1	3	24 mg/mL	0,6 mg/mL	60
4	24 mg/mL	Paso3	1	1	12 mg/mL	0,3 mg/mL	30
5	24 mg/mL	Paso3	1	3	6 mg/mL	0,15 mg/mL	15
6	24 mg/mL	Paso3	1	7	3 mg/mL	0,075 mg/mL	7,5
7	3 mg/mL	Paso6	1	1	1,5 mg/mL	0,00375 mg/mL	3,75

\*Se tomó 0,5 mL de la concentración intermedia para un volumen final de 20 mL de agar LB.

**Tabla 7. Tamaño de halos de inhibición (mm) en la Prueba de Disco Difusión.**

Cepas	Antibióticos											
	Te	Nor	C	CIP	R	EM	P	VA	LVX	S	Da	AZT
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	28	25	25	26	31	21	39	19	32	18.5	26	21
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	11	24	28	23	23	15	21.5	20	21	12	8	9.5
<b><i>E. durans</i> 2</b>	20	19	14	20	11	20	15	21	20	9	9	15
<i>E. durans</i> 4	22.5	20.5	22	21	22	24.5	33	22	16.5	10	27.5	26.5
<i>E. durans</i> 5	22.5	16.5	18	13	18.5	24	20.9	23	19	10	20	21
<i>E. durans</i> 10	21.5	16.5	18.5	16.5	11	20.5	30.5	17.5	16.5	0	13.5	21.5
<i>E. durans</i> 11	18.5	17	19	16	18	21	20.5	17	16.5	0	9.5	19.5
<i>E. durans</i> 12	20	16.5	17	14	17	20.5	21.5	19	15	0	10	19
<i>E. durans</i> 28	19	17	24	20	24	17	24	24	20	0	0	
<i>E. durans</i> 30	20	15	19	15	15	18	21	21	14	0	12	17.5
<i>E. durans</i> 32	22	16	20	16.5	20	20	23	16	17.5	0	13	21
<b><i>E. faecium</i> 7</b>	21	19	21	17	10	24.5	18	19.5	19	0	0	19
<i>E. faecium</i> 13	25	19	19	22	10	10	11	21	17.5	9	12	8.5
<i>E. faecium</i> 14	21	22	25	18	14	12	32	25	19	0	0	8.5
<i>E. faecium</i> 65	24	24	26	24	0	15	27	23	23	8	19	13.5
<i>E. faecium</i> 66	19	19.5	20	22	10	13	19	19	20	10	19	10
<i>E. faecium</i> 70	23.5	8.5	19	21.5	10	13	22	20	16	0	11	12
<i>E. faecium</i> 89	20	20	25	21	33	19	0	22	22	0	26	13
<i>E. faecium</i> 90	19	17	21	15	21	15	25	19	14	0	0	14
<b><i>E. faecalis</i> 17</b>	10	23	22	20	20	21	23	20	20	8	8	29
<i>E. faecalis</i> 18	18.5	18.5	18.5	19	21.5	22	26	18	21	0	11	20.5
<i>E. faecalis</i> 26	27	23	26	23.5	22	26	20.5	21	23	15	19.5	22.5
<i>E. faecalis</i> 27	33	34	30	33	30	31	29	23	36	15	34	30
<i>E. faecalis</i> 42	25	26	22	15	33	12.5	25	21	20	0	19	24
<i>E. faecalis</i> 43	21	16	16	21	17	10	24	23	22	0	0	0
<b><i>E. hirae</i> 8</b>	25	24.5	22	24	18.5	30.5	22.5	22.5	21	8	23	22
<i>E. hirae</i> 15	11	12	15	14	20	15	13.5	15	14	7	8	14
<i>E. hirae</i> 20	21	11.5	19.5	21	6	22	33	25	20	0	20	25
<i>E. hirae</i> 22	21	22	20	23	21	24	22	20	21	0	0	22
<i>E. hirae</i> 23	18	17.5	17	15	16.5	17	19	16	14	0	13	16
<i>E. hirae</i> 29	19	16	17.5	17	22	20.5	18	21.5	16.5	0	19	19
<i>E. hirae</i> 31	19	20	23	20	15	28	25	25	18	0	0	22
<i>E. hirae</i> 40	18	19	21	19	18	23	31	21	18.5	8	23	22

Resistente,

Intermedio,

Sensible.

Tetraciclina (Te); norfloxacin (Nor), cloramfenicol (C), ciprofloxacina (Cip), rifampicina (R), eritromicina (EM), penicilina (P), vancomicina (VA), levofloxacina (LVX), streptomycin (S), clindamicina (DA), azitromicina (AZT).

**Tabla 8. Número de cepas resistentes por antibiótico.**

	<b>Antibióticos</b>											
	Te	Nor	C	CIP	R	EM	P	VA	LVX	S	Da	AZT
<b>R</b>	2	3	0	7	11	6	3	0	0	19	19	11
<b>I</b>	4	7	6	12	7	15	-	3	10	7	-	-
<b>S</b>	25	21	25	12	13	10	28	28	21	5	12	20
<b>Total</b>	31 cepas											

El cuadro muestra el número de cepas que se mostraron resistentes (R), intermedios (I) y sensibles (S) a cada uno de los 12 antibióticos utilizados en el estudio. Los antibióticos a los que mostraron más resistencia fue clindamicina y estreptomicina. Tetraciclina (Te); norfloxacin (Nor), cloramfenicol (C), ciprofloxacina (Cip), rifampicina (R), eritromicina (EM), penicilina (P), vancomicina (VA), levofloxacina (LVX), streptomycin (S), clindamicina (DA), azitromicina (AZT).

**Tabla 9. Resultados obtenidos con la prueba de difusión en disco para 31 cepas de *Enterococcus* spp de origen marino.**

Resultado	Resistencia / Sensibilidad a antibióticos n = 31													
	Te		Nor		C		CIP		R		EM		P	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>Resistente</b>	2	6,5	3	9,7	0	0	7	22,6	11	35,5	6	19,3	3	9,7
<b>Intermedio</b>	4	12,9	7	22,6	6	19,4	12	38,7	7	22,6	15	48,4	0	0
<b>Sensible</b>	25	80,6	21	67,7	25	80,6	12	38,7	13	41,9	10	32,3	28	90,3

tetraciclina (Te); norfloxacin (Nor), cloramfenicol (C), ciprofloxacina (Cip), rifampicina (R), eritromicina (EM), penicilina (P), vancomicina (VA), levofloxacina (LVX), streptomycin (S), clindamicina (DA), azitromicina (AZT).

**Tabla 10. Antibiotipos expresados por *Enterococcus* spp. de origen marino.**

Especie	Antibiotipo	Nº	%
<i>E. faecium</i>	NOR, R, EM, S, Da, AZT	1	3.2
<i>E. hirae</i>	Te, NOR, CIP, P, Da, AZT	1	3.2
<i>E. faecium</i> ,	R, EM, P, Da, AZT	1	3.2
<i>E. faecium</i>	R, EM, S, Da, AZT	1	3.2
<i>E. faecium</i>	CIP, S, Da, AZT	1	3.2
<i>E. durans</i>	CIP, R, S, Da	1	3.2
<i>E. faecalis</i>	EM, S, Da, AZT	1	3.2
<i>E. durans</i>	R, Da, AZT	1	3.2
<i>E. durans</i> <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i>	R, S, Da	3	9.7
<i>E. durans</i> <i>E. hirae</i>	CIP, S, Da	2	6.5
<i>E. faecium</i>	R, EM, AZT	1	3.2
<i>E. faecium</i>	P, S, AZT	1	3.2
<i>E. faecalis</i>	CIP, EM, S	1	3.2
<i>E. hirae</i>	NOR, R, S	1	3.2
<i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. hirae</i>	S, Da	5	16.1
<i>E. faecium</i>	R, AZT	1	3.2
<i>E. faecalis</i>	Te, Da	1	3.2
<i>E. durans</i>	CIP	1	3.2
<i>E. hirae</i>	S	1	3.2
<i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. faecalis</i>	No resistencia	5	16.1
<b>TOTAL DE CEPAS</b>		<b>31</b>	<b>100</b>

tetraciclina (Te), norfloxacin (Nor), cloramfenicol (C), ciprofloxacina (CIP), rifampicina (R), eritromicina (EM), penicilina (P), vancomicina (VA), levofloxacina (LVX), estreptomicina (S), clindamicina (Da), azitromicina (AZT).

**Tabla 11. Resultados de la prueba de CMI para ciprofloxacina.**

CEPAS	CIPROFLOXACINA (µg/ml)							
	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160
<b><i>E.hirae</i>15</b>	+	+	+	+	+-	+-	+-	-
<b><i>E.hirae</i>23</b>	+	+	+	+	+	+	+-	-
<i>E.hirae</i> 29	+	+	+	+-	+-	+-	-	-
<i>E.hirae</i> 40	+	+	+	+	+-	-	-	-
<i>E.hirae</i> 31	+	+	+	+	+-	+-	+-	-
<i>E.durans</i> 2	+	+	+-	+-	+-	+-	+-	-
<i>E.durans</i> 28	+	+	+-	+-	+-	+-	+-	-
<i>E.durans</i> 32	+	+	+	+-	+-	-	-	-
<i>E.durans</i> 10	+	+	+	+	+-	+-	+-	-
<i>E.durans</i> 11	+	+	+	+	+-	+-	+-	-
<i>E.faecium</i> 7	+	+	+	+	+	+	+	-
<b><i>E.faecium</i>90</b>	+	+	+	+	+	+-	+-	-
<i>E.faecium</i> 14	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>E.faecalis</i> 18	+	+	+-	+-	+-	+-	-	-
<b><i>E.faecalis</i>42</b>	+	+	+	+	+	+	+-	-
<i>E.faecalis</i> 17	+	+	+-	+-	+-	+-	-	-

Las filas sombreadas indican las cinco cepas resistentes encontradas por CMI. Las cepas en negrita son las halladas resistentes por el método de disco difusión. Se consideraron resistentes aquellas cepas que crecían a 10 µg/ml. Crecimiento (+), crecimiento pobre (+-), no hubo crecimiento (-).

**Tabla12. Resultados de la prueba de CMI para norfloxacina.**

CEPAS	NORFLOXACINA(µg/ml)						
	1.25	2.5	5	10	20	40	80
<i>E.durans</i> 5	+	+	+	+	+	+-	-
<i>E.durans</i> 10	+	+	+-	+-	+-	-	-
<i>E.durans</i> 12	+	+	+-	+-	+-	-	-
<b><i>E.hirae</i> 15</b>	+	+	+	+-	+-	-	-
<b><i>E.hirae</i> 20</b>	+	+	+	+	+-	-	-
<i>E.hirae</i> 29	+	+	+	+	+	-	-
<i>E.durans</i> 30	+	+	+	+-	+-	-	-
<i>E.durans</i> 32	+	+	+	+-	+-	-	-
<i>E.faecalis</i> 43	+	+	+	+-	+-	-	-
<b><i>E.faecium</i>70</b>	+	+	+	+	+	+-	-

Las filas sombreadas indican las cinco cepas resistentes encontradas por CMI. Las cepas en negrita son las halladas resistentes por el método de disco difusión. Se consideraron resistentes aquellas cepas que crecían a 5 µg/ml Crecimiento (+), crecimiento pobre (+-), no hubo crecimiento (-).



**Tabla13. Resultados de la prueba de CMI para estreptomicina.**

CEPAS	ESTREPTOMICINA (µg/ml)						
	37.5	75	150	300	600	1200	2400
<i>E.durans</i> 2	+	+	+-	+-	+-	-	-
<b><i>E.faecium</i> 7</b>	+	+	+	+-	+-	-	-
<i>E.hirae</i> 8	+	+	+-	-	-	-	-
<b><i>E.durans</i>10</b>	+	+	+	+-	+-	+-	+-
<i>E.faecium</i> 13	+	+	+-	+-	+-	-	-
<i>E.faecium</i> 65	+	+	+	+-	+-	-	-
<i>E.hirae</i> 15	+	+	+	+	+	+	+
<i>E.faecalis</i> 17	+	+	+	+-	+-	-	-
<b><i>E.faecalis</i>18</b>	+	+	+	+-	+-	-	-
<b><i>E.hirae</i> 20</b>	+	+	+	+-	+-	-	-
<b><i>E.hirae</i> 22</b>	+	+	+	+-	+-	-	-
<b><i>E.hirae</i> 23</b>	+	+	+	+	+-	+-	-
<b><i>E.hirae</i>29</b>	+	+	+	+	+-	-	-
<b><i>E.durans</i> 30</b>	+	+	+	+-	+-	-	-
<b><i>E.durans</i> 32</b>	+	+	+	+-	+-	-	-
<i>E.hirae</i> 40	+	+	+-	+-	+-	-	-
<b><i>E.faecalis</i>43</b>	+	+	+	-	-	-	-
<b><i>E.faecium</i>70</b>	+	+	+	+-	+-	+-	+-

Las filas sombreadas indican las tres cepas resistentes halladas por CMI. Las cepas en negrita son las encontradas resistentes por el método de disco difusión. Se consideraron resistentes aquellas cepas que crecían a 150 µg/ml. Crecimiento (+), crecimiento pobre (+-), no hubo crecimiento (-).

**Tabla14. Resultados de la prueba de CMI para eritromicina.**

CEPAS	ERITROMICINA (µg/ml)						
	3.75	7.5	15	30	60	120	240
<i>E.durans</i> 2	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.durans</i> 10	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.durans</i> 11	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.durans</i> 12	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.faecium</i> 65	+	+	+	+-	-	-	-
<i>E.hirae</i> 15	+	+	+	-	-	-	-
<i>E.faecalis</i> 18	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.hirae</i> 20	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.hirae</i> 23	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.hirae</i> 29	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.durans</i> 30	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.durans</i> 32	+	+-	+-	-	-	-	-
<b><i>E.faecalis</i>43</b>	+	+	+	+	+	+	+
<i>E.faecalis</i> 17	+	+-	+-	-	-	-	-
<i>E.faecium</i> 89	+	+-	+	-	-	-	-
<i>E.faecium</i> 90	+	+	+	+-	+-	-	-

Las filas sombreadas indican las tres cepas resistentes encontradas por MIC. Las cepas en negrita son las halladas resistentes por el método de disco difusión. Se consideraron resistentes aquellas cepas que crecían a 15 µg/ml Crecimiento (+), crecimiento pobre (+-), no hubo crecimiento (-).

**Tabla 15. Número de cepas resistentes totales por antibiótico.**

	ANTIBIOTICO			
	Nor	CIP	EM	S
<b>Nº Resistentes</b>	8	12	9	22
<b>Nº Sensibles</b>	23	19	22	9

Los datos mostrados son para los antibióticos que se emplearon en la prueba de Concentración Mínima de Inhibición (CMI). Norfloxacin (Nor), Ciprofloxacina (Cip), Eritromicina (EM), Streptomycin (S).

**Tabla 16. Número de resistencias por cada una de las especies.**

ESPECIES DE <i>Enterococcus</i>	ANTIBIÓTICOS									TOTAL
	Te	Nor	CIP	R	EM	P	S	Da	AZT	
<i>E.durans</i>	0	3	6	3	0	0	6	7	1	26
<i>E.faecalis</i>	1	1	1	0	2	0	4	3	1	13
<i>E.faecium</i>	0	1	3	6	6	2	6	5	7	36
<i>E.hirae</i>	1	3	2	2	1	1	6	4	2	22
<b>TOTAL</b>	2	8	12	11	9	3	22	19	11	
<b>PORCENTAJES</b>	<b>6,5</b>	<b>26</b>	<b>39</b>	<b>35</b>	<b>29</b>	<b>10</b>	<b>71</b>	<b>61</b>	<b>35</b>	

\*Porcentaje basado en las 31 cepas empleadas. Sólo se indican los antibióticos al que mostraron resistencia. tetraciclina (Te), norfloxacin (Nor), ciprofloxacina (CIP), rifampicina (R), eritromicina (EM), penicilina (P), estreptomycin (S), clindamicina (Da), azitromicina (AZT).

**TABLA 17. Especies de *Enterococcus* resistentes a los antibióticos empleados**

ESPECIES	ANTIBIÓTICOS				
	NOR	CIP	EM	S	R
<i>E.durans</i> 5	√	√			√
<i>E.durans</i> 10		√		√	√
<i>E.durans</i> 11		√		√	
<i>E.durans</i> 12		√		√	
<i>E.durans</i> 28		√		√	
<i>E.durans</i> 30	√	√		√	√
<i>E.durans</i> 32	√			√	
<i>E.faecium</i> 7		√		√	√
<i>E.faecium</i> 13			√		√
<i>E.faecium</i> 14		√	√	√	√
<i>E.faecium</i> 65			√	√	√
<i>E.faecium</i> 66			√		√
<i>E.faecium</i> 70	√		√	√	√
<i>E.faecium</i> 89				√	
<i>E.faecium</i> 90		√	√	√	
<i>E.faecalis</i> 17				√	
<i>E.faecalis</i> 18				√	
<i>E.faecalis</i> 42		√	√	√	
<i>E.faecalis</i> 43	√		√	√	
<i>E.hirae</i> 15	√	√	√	√	
<i>E.hirae</i> 20	√			√	√
<i>E.hirae</i> 22				√	
<i>E.hirae</i> 23		√		√	
<i>E.hirae</i> 29	√			√	
<i>E.hirae</i> 31		√		√	√

Los datos mostrados son para los antibióticos que se emplearon en la prueba de Concentración Mínima de Inhibición (CMI) y de rifampicina. Norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP), rifampicina (R), eritromicina (EM), estreptomycin (S). (√) cepa seleccionada.

**Tabla 18. Estandarización del porcentaje de SDS para la curación de plásmido.**

CONCENTRACIÓN SDS (%)	ESPECIES			
	<i>E.faecium</i> 70	<i>E.faecalis</i> 43	<i>E.durans</i> 10	<i>E.hirae</i> 15
1	-	-	-	-
0,1	-	-	-	-
0,05	-	-	-	-
0,01	-	-	-	-
0,005	-	-	-	-
0,004	-	-	-	+
0,0035	-	+	-	+
0,003	+	+	*	+
0,0025	+	+	*	+
0,002	+	+	+	+
0,0015	+	+	+	+
0,001	+	+	+	+
0,0009	+	+	+	+
0,0007	+	+	+	+
0,0006	+	+	+	+
0,0005	+	+	+	+
0,0004	+	+	+	+
0,0003	+	+	+	+
0,0002	+	+	+	+

Cremiento de las cuatro especies de *Enterococcus* utilizadas para estandarizar la concentración de SDS para la curación. La fila sombreada indica la concentración elegida. Crecimiento (+), crecimiento pobre ( \* ), no hubo crecimiento ( - ).

**Tabla 19 Tamaño de los halos de inhibición (mm) antes y después de la curación con Sodio Dodecil Sulfato (SDS) 0.003%.**

ESPECIES	ANTIBIÓTICOS							
	S		EM		NOR		CIP	
	A	D	A	D	A	D	A	D
<i>E.durans</i> 11	0	19					16	40
<i>E.durans</i> 12	0	21					14	30,5
<i>E.durans</i> 28	0	20					15	27
<i>E.durans</i> 32	0	15			16	38		
<i>E.faecium</i> 89	0	18						
<i>E.faecium</i> 90	0	16	15	30			15	31
<i>E.faecalis</i> 17	0	12						
<i>E.faecalis</i> 18	0	16						
<i>E.faecalis</i> 42	0	15	12.5	37				
<i>E.faecalis</i> 43	0	11	10	35	16	36		
<i>E.hirae</i> 15	0	11	15	31	12	28	14	26
<i>E.hirae</i> 22	0	14						
<i>E.hirae</i> 23	0	11					15	25
<i>E.hirae</i> 29	0	16			16	32		

Las filas sombreadas indican aquellas especies que presentaban sensibilidad intermedia a rifampicina.

A, antes del tratamiento; D, después del tratamiento.

**Tabla 20. MIC para cepas con sensibilidad intermedia a rifampicina**

Especies	Control	Concentración de Rifampicina (µg/mL)					
		1,875	3,75	7,5	15	30	60
<i>E.durans</i> 11	+	+	+	+-	-	-	-
<i>E.durans</i> 12	+	+	+-	+-	+-	-	-
<i>E.hirae</i> 23	+	+	+-	+-	-	-	-
<i>E.faecalis</i> 43	+	+	+	+-	+-	-	-

Son consideradas resistentes aquellas que crecen en concentración de 7.5 µg/mL. Control: 0 µg/mL de rifampicina. Crecimiento (+), crecimiento pobre (+-), no hubo crecimiento (-).

**Tabla 21. Cepas que serán utilizadas para la prueba de conjugación.**

ESPECIES	ANTIBIOTICOS			
	NOR	CIP	EM	S
<i>E.durans</i> 11				√
<i>E.durans</i> 12		√		•
<i>E.durans</i> 28				√
<i>E.durans</i> 32				√
<i>E.faecium</i> 89				√
<i>E.faecium</i> 90		√		•
<i>E.faecalis</i> 17				√
<i>E.faecalis</i> 18				√
<i>E.faecalis</i> 42			√	•
<i>E.faecalis</i> 43			√	•
<i>E.hirae</i> 15	√			•
<i>E.hirae</i> 22				√
<i>E.hirae</i> 23		√		•
<i>E.hirae</i> 29	√			•

Se indican las especies de *Enterococcus* que serán utilizadas para la conjugación con cada uno de los antibióticos mencionados. (•) indica las cepas que fueron adicionadas posteriormente para este antibiótico. Norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (EM), estreptomycin (S).

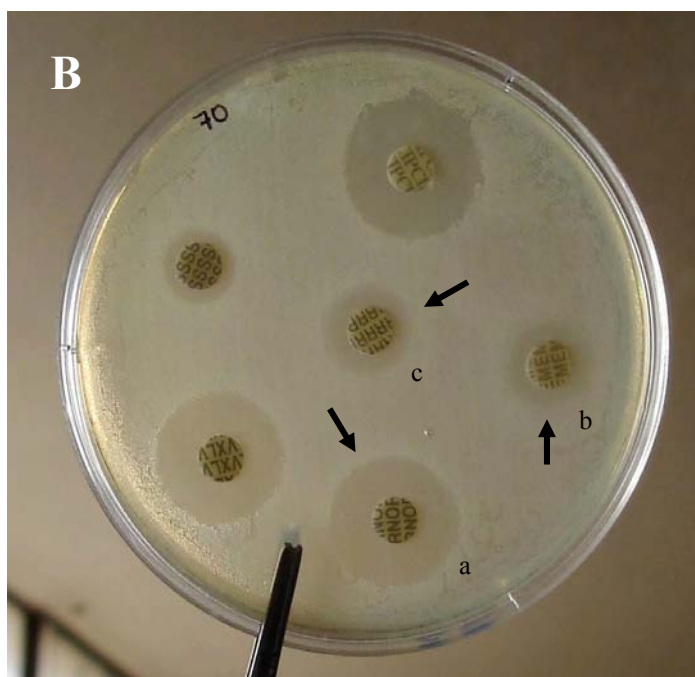
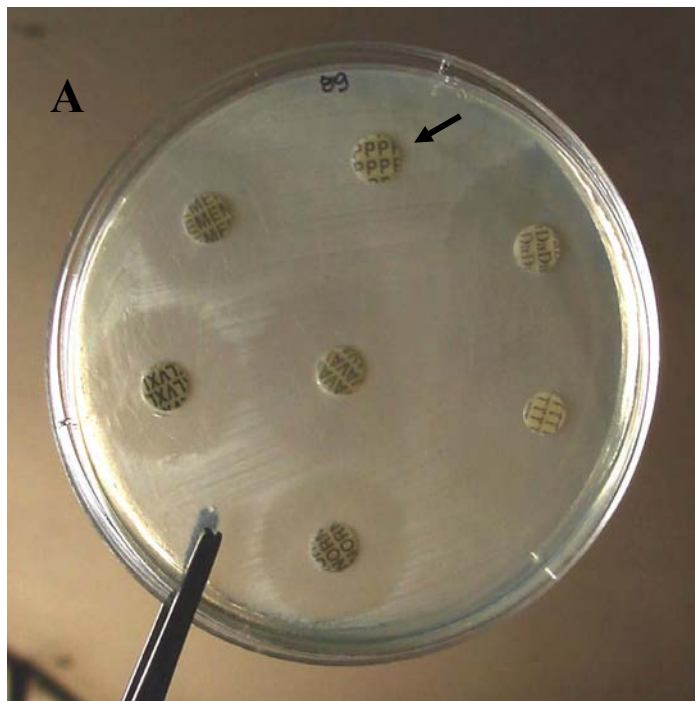
**Tabla 22. Recuento de Transconjugantes.**

ESPECIES	RECuento			NÚMERO DE DONADORAS	NÚMERO DE TRANSCONJUGANTES	INDICE DE CONJUGAC.
	-4	-5	-6			
<i>E.faecalis</i> 17	550	44	4	$45 \times 10^6$	1520 (-1)	$3 \times 10^{-2}$
<i>E.faecalis</i> 18	1408	152	16	$16 \times 10^7$	1	$6 \times 10^{-6}$
<i>E.hirae</i> 22	1088	111	10	$11 \times 10^7$	2	$2 \times 10^{-5}$
<i>E.hirae</i> 29	*	834	82	$82 \times 10^7$	7	$9 \times 10^{-6}$
<i>E.durans</i> 32	*	1600	201	$2 \times 10^8$	63	$3 \times 10^{-5}$
<i>E.faecalis</i> 42	788	79	0	$79 \times 10^6$	1	$1 \times 10^{-6}$
<i>E.faecalis</i> 43	820	76	6	$73 \times 10^6$	800 (-1)	$1 \times 10^{-1}$
<i>E.faecium</i> 89	*	690	84	$84 \times 10^7$	8	$9 \times 10^{-2}$

Se observan las transconjugantes de las cepas 17, 18, 22, 29, 32, 42 y 89, para estreptomycin. La cepa 43 mostró un transconjugante para eritromicina. (\*) número incontable de colonias, (-1) dilución adicional.

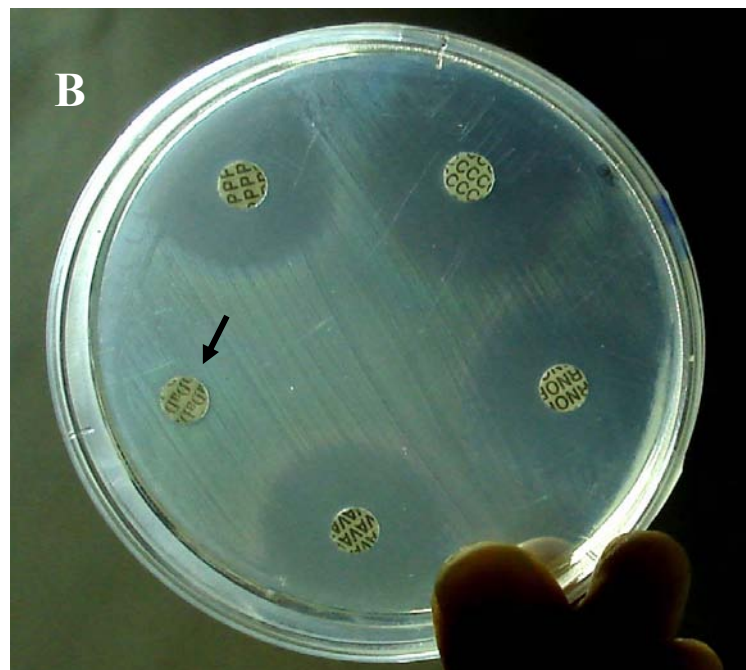
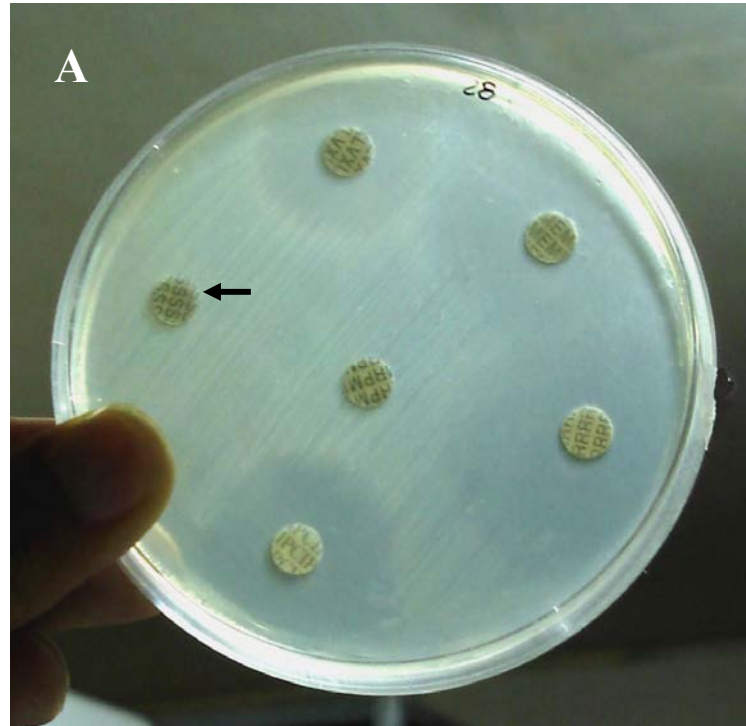
## 9.2 FIGURAS

FIG.1. MÉTODO DE KIRBY & BAUER.



Se observan los halos de resistencia y susceptibilidad a diferentes antibióticos. **A:** *Enterococcus faecium* 89, muestra resistencia a Penicilina. **B:** *Enterococcus faecium* 70 muestra resistencia a norfloxacin (a), eritromicina (b) y rifampicina (c).

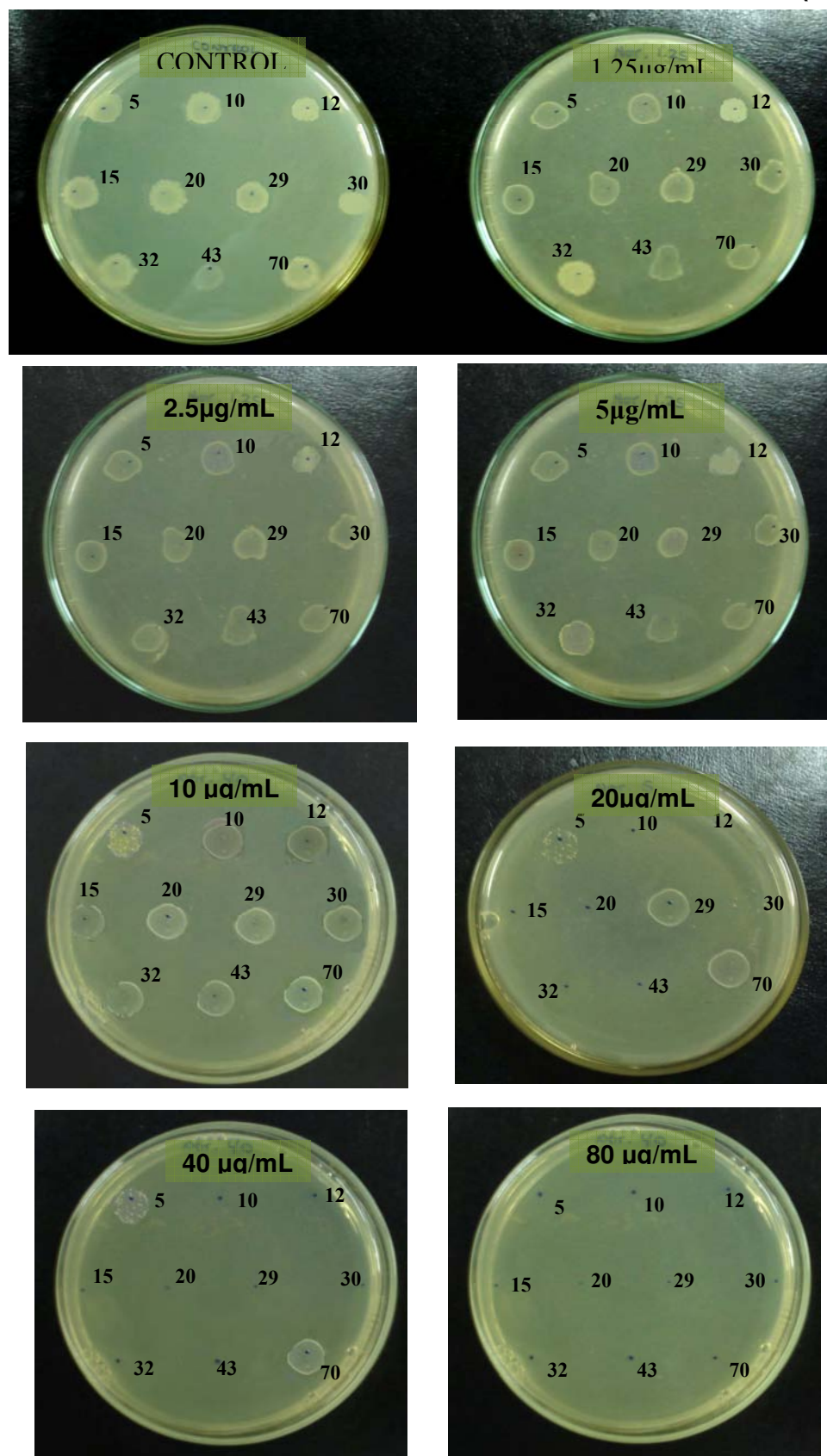
**FIG.2. MÉTODO DE KIRBY & BAUER.**



**A:** *Enterococcus durans* 28, muestra resistencia a estreptomicina.  
**B:** *Enterococcus hirae* 31 muestra resistencia a clindamicina.



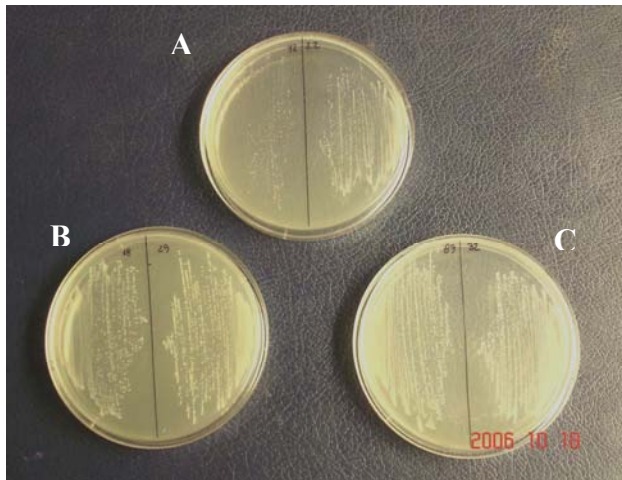
**FIG. 3 PRUEBA DE CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (MIC)**



Placas con agar Muller Hinton conteniendo siete concentraciones de norfloxacin, y una placa control sin antibiótico. Cada una de las cepas de *Enterococcus* fueron sembradas por moteado. Los números indican el numero de registro cada cepa.

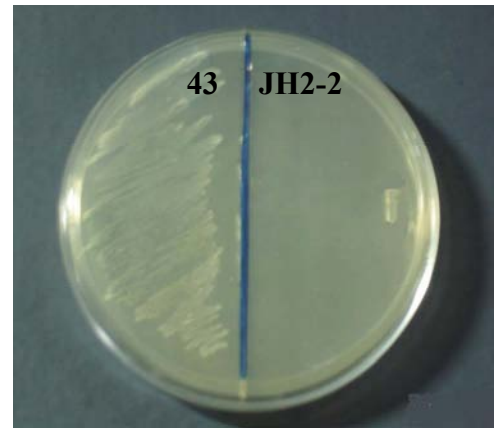
**FIG. 4. CONTROL DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DONADORAS Y RECEPTORAS EN ERITROMICINA Y RIFAMPICINA.**

**CONTROLES DE DONADORAS EN ESTREPTOMICINA**



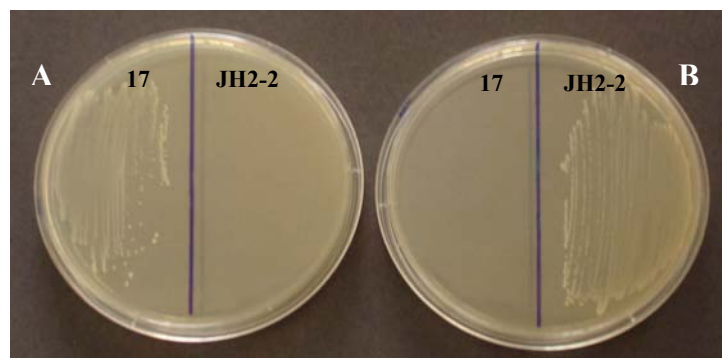
Cepas resistentes a estreptomicina. Crecimiento de las cepas 42 y 22 (A), 18 y 29 (B), 89 y 32 (C) en agar BHI con estreptomicina (1000 µg/mL).

**CONTROL DE DONADORA EN ERITROMICINA**



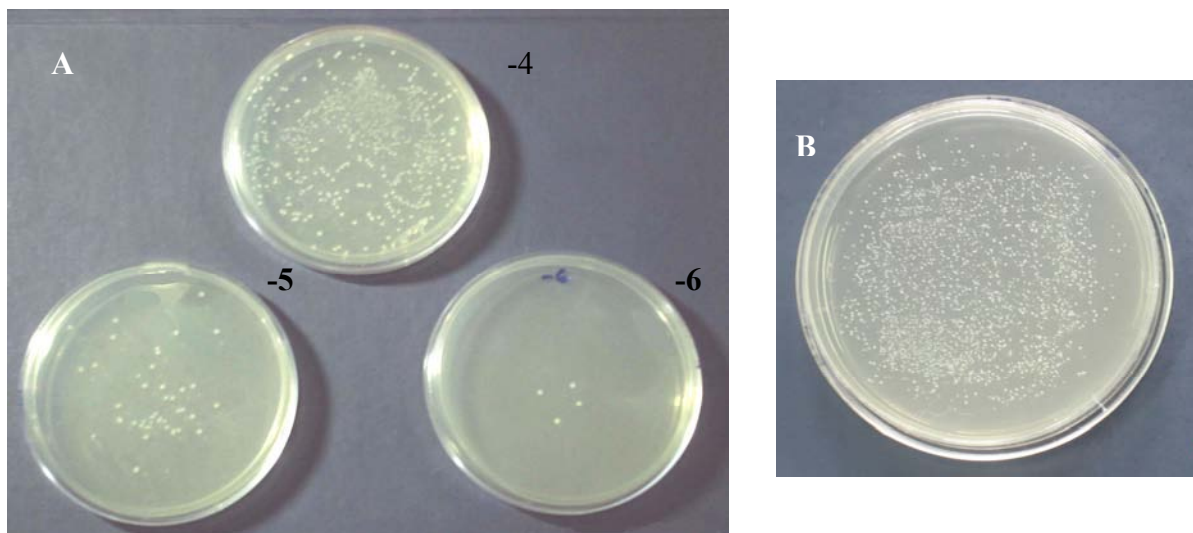
Placa con agar BHI conteniendo eritromicina (22 µg/mL). Observar crecimiento de la cepa donadora (izq.), y no de la receptora (der.).

**CONTROL DE DONADORA Y RECEPTORA EN ESTREPTOMICINA Y RIFAMPICINA**

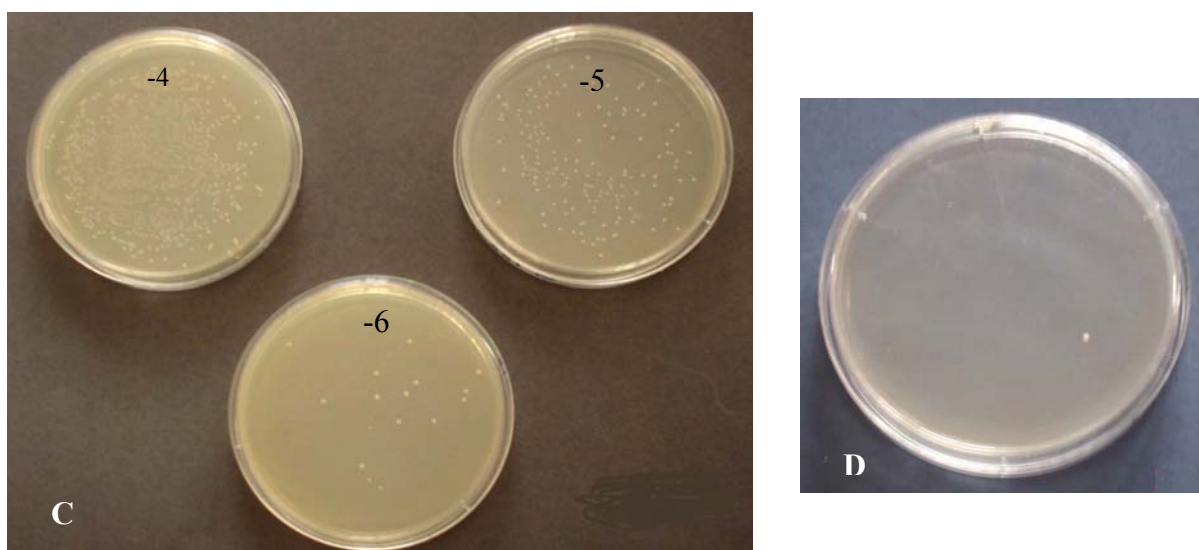


A: Placa con agar BHI conteniendo estreptomicina (1000 µg/mL). B: Placa con agar BHI conteniendo rifampicina (72 µg/mL). Se observa el crecimiento de la cepa donadora (17) en A y no en B, de lo contrario la cepa donadora JH2-2 no crece en A pero si en B.

**FIG. 5. RECuento DE CEPAS DONADORAS Y TRANSCONJUGANTES RESISTENTES A ESTREPTOMICINA**

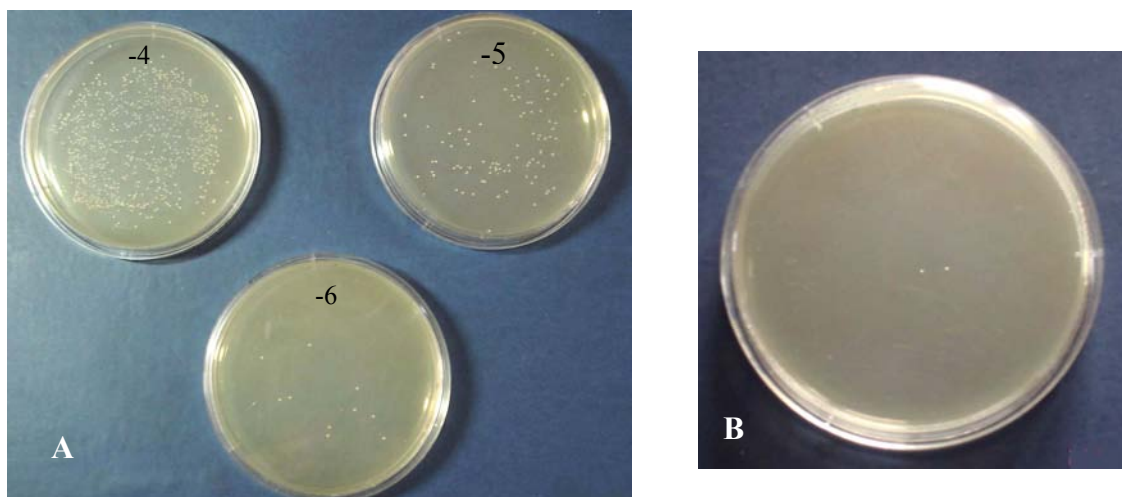


**A:** Placas conteniendo agar BHI con estreptomicina (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) Recuento de donadoras de la cepa *Enterococcus faecalis* 17 en las diluciones -4, -5 y -6. **B:** Placa conteniendo agar BHI con estreptomicina y rifampicina (75  $\mu\text{g/mL}$ ). Recuento de colonias transconjugantes en la dilución -1

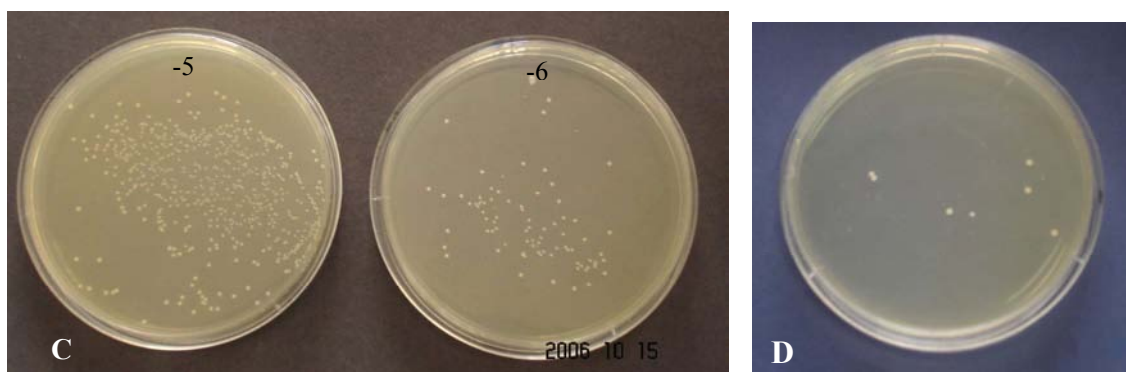


**C:** Placas conteniendo agar BHI con estreptomicina (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) Recuento de donadoras de la cepa *Enterococcus faecalis* 18 en las diluciones -4, -5 y -6. **D:** Placa conteniendo agar BHI con estreptomicina y rifampicina (75  $\mu\text{g/mL}$ ). Recuento de colonias transconjugantes en la dilución -1

**FIG. 6. RECUENTO DE CEPAS DONADORAS Y TRANSCONJUGANTES RESISTENTES A ESTREPTOMICINA**



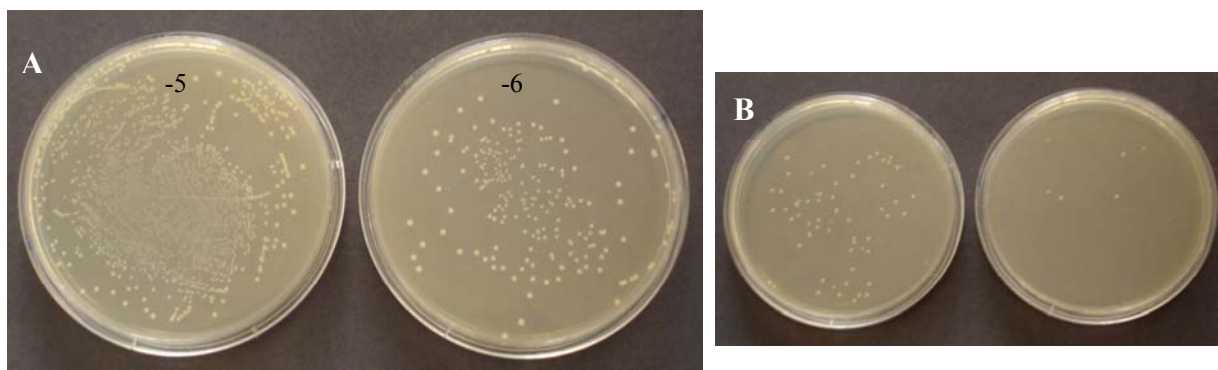
**A:** Placas conteniendo agar BHI con estreptomicina (1000 µg/mL) Recuento de donadoras de la cepa *Enterococcus hirae* 22 en las diluciones -4, -5 y -6. **B:** Placa conteniendo agar BHI con estreptomicina y rifampicina (75 µg/mL). Recuento de colonias transconjugantes en la dilución -1



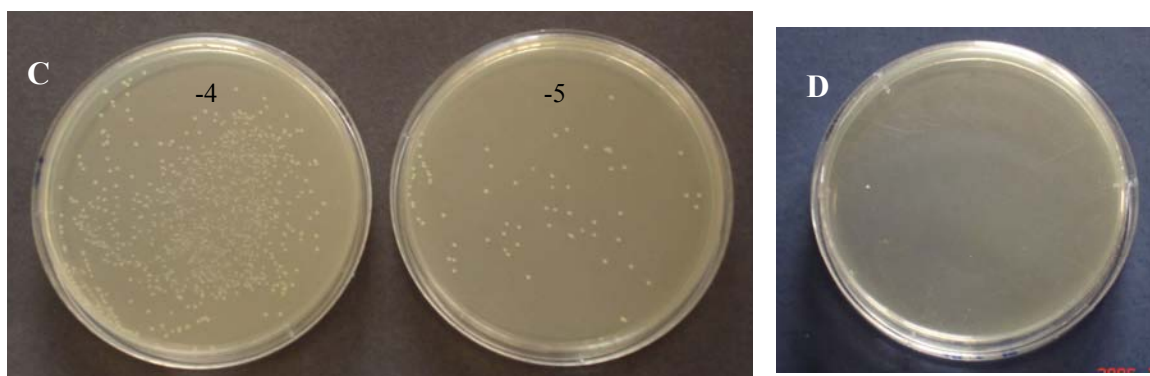
**C:** Placas conteniendo agar BHI con estreptomicina (1000 µg/mL) Recuento de donadoras de la cepa *Enterococcus hirae* 29 en las diluciones -5 y -6. **D:** Placa conteniendo agar BHI con estreptomicina y rifampicina (75 µg/mL). Recuento de colonias transconjugantes en la dilución -1



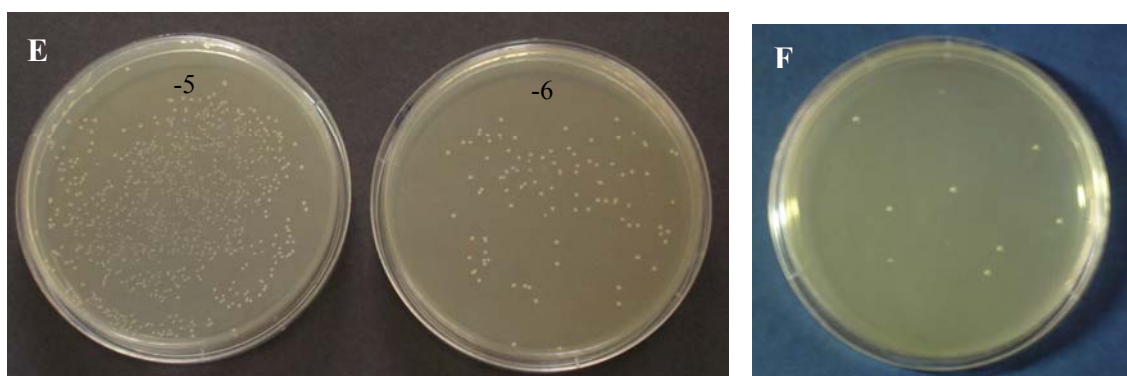
**FIG. 7. RECuento DE CEPAS DONADORAS Y TRANSCONJUGANTES RESISTENTES A ESTREPTOMICINA**



**A:** Placas conteniendo agar BHI con estreptomicina (1000 µg/mL) Recuento de donadoras de la cepa *Enterococcus durans* 32 en las diluciones -5 y -6. **B:** Placa conteniendo agar BHI con estreptomicina y rifampicina (75 µg/mL). Recuento de colonias transconjugantes en la dilución -1

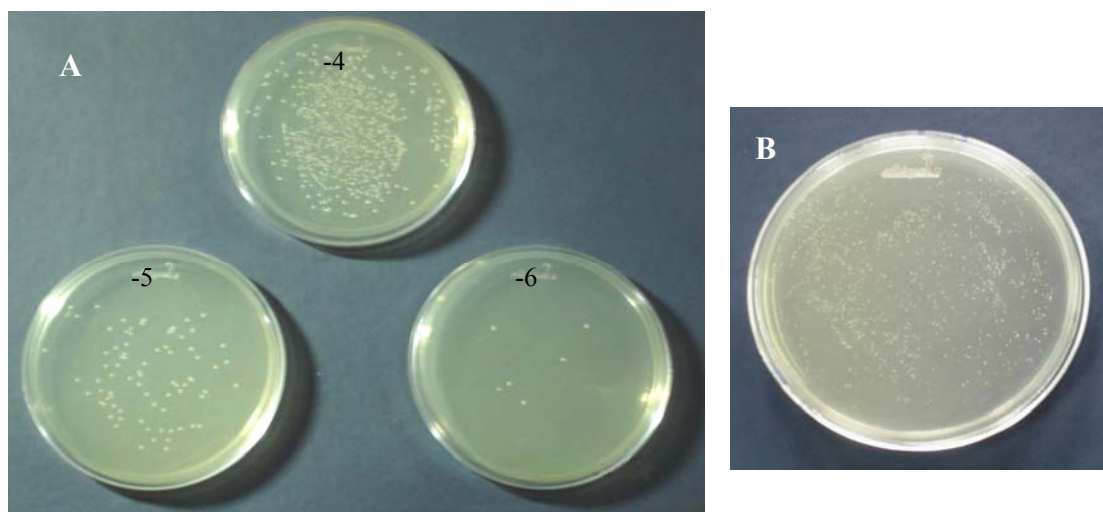


**C:** Placas conteniendo agar BHI con estreptomicina (1000 µg/mL) Recuento de donadoras de la cepa *Enterococcus faecalis* 42 en las diluciones -4 y -5. **D:** Placa conteniendo agar BHI con estreptomicina y rifampicina (75 µg/mL). Recuento de colonias transconjugantes en la dilución -1



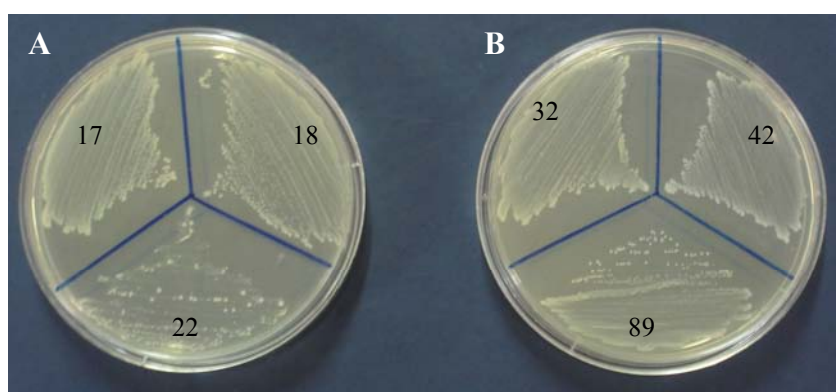
**E:** Placas conteniendo agar BHI con estreptomicina (1000 µg/mL) Recuento de donadoras de la cepa *Enterococcus faecium* 89 en las diluciones -5 y -6. **F:** Placa conteniendo agar BHI con estreptomicina y rifampicina (75 µg/mL). Recuento de colonias transconjugantes en la dilución -1

**FIG. 8. RECUENTO DE CEPAS DONADORAS Y TRANSCONJUGANTES RESISTENTES A ERITROMICINA**



**A:** Placas conteniendo agar BHI con eritromicina (22 µg/mL) Recuento de donadoras de la cepa *Enterococcus faecalis* 43 en las diluciones -4, -5 y -6. **B:** Placa conteniendo agar BHI con estreptomicina y rifampicina (72 µg/mL). Recuento de colonias transconjugantes en la dilución -1

**FIG. 9 TRANSCONJUGANTES CON RESISTENCIA A ESTREPTOMICINA**



Crecimiento de las colonias transconjugantes en medio BHI con estreptomicina (1000 µg/mL). **A:** Transconjugantes de las cepas donadoras 17, 18, 22 y **B:** 32, 42 y 89 resistentes a estreptomicina.

## FIG. 10. EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO

Cultivo de toda la noche



Centrifugar

Resuspensión de pellet

Lisis

Neutralización



Centrifugar



Adicionar la resina y el lisado a la jeringa insertada en la minicolumna

Presionar la resina dentro de la minicolumna con ayuda del émbolo.

Sacar la jeringa, remover el émbolo y poner de nuevo la jeringa a la minicolumna

Adicionar solución de lavado y hacer pasar a través de la minicolumna, con el émbolo.



Transferir la minicolumna a un tubo nuevo



Centrifugar



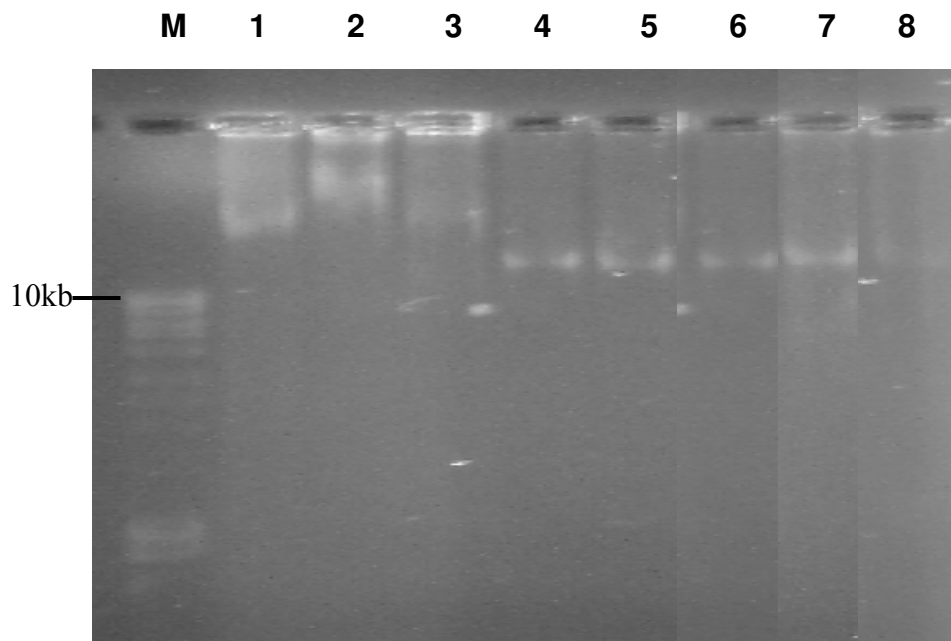
Transferir la minicolumna a un tubo nuevo y lavar.



Centrifugar y eluir el plásmido

Imagen que muestra ilustrativamente el método de extracción del plásmido utilizando el kit de extracción *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System*.

**FIG. 12 CORRIDA ELECTROFÓRÉTICA  
DE LOS PLÁSMIDOS**



Se observan que el tamaño de los plásmidos extraídos de las colonias transconjugantes, poseen tamaños superiores a 10kb. M: marcador, 1: *E.faecalis* 17, 2: *E.faecalis* 18, 3: *E.hirae* 22, 4: *E.hirae* 29, 5: *E.durans* 32, 6: *E.faecalis* 42, 7: *E.faecalis* 43, 8: *E.faecium* 89.,



### 9.3 Medios de Cultivo y Soluciones

#### Agar Luria - Bertolli

Triptona .....	10.0 g
Extrato de levadura .....	5.0 g
Cloruro de sodio .....	5.0 g
Agar .....	7.0 g
Agua destilada .....	1000.0 mL
pH 7.0 ± 0.1	

Autoclavar.

Para usar el medio en ceparios, reducir a la mitad la cantidad de agar.

#### Agar Bilis Esculina

Extracto de hígado .....	3.0 g
Digestión pancreática de gelatina.....	5.0 g
Oxibile .....	40.0 g
Esculina .....	1.0 g
Citrato férrico .....	0.5 g
Agar .....	15.0 g
Agua destilada .....	1000.0 mL
pH final a 25°C: 6.6 ± 0.2	

Autoclavar.

#### Agar Cerebro Corazón ( Brain Heart Infusión: BHI)

Infusión de cerebro .....	12.5 g
Infusión de corazón .....	5.0 g
D (+) glucosa .....	2.0 g
Cloruro de sodio .....	5.0 g
Di sodio hidrógeno fosfato .....	2.5 g

Agar ..... 15.0 g  
 Agua destilada .....1000.0 mL  
 pH 7.4 ± 0.1

Autoclavar.

### **Caldo Cerebro Corazón ( Brain Heart Infusión: BHI)**

Infusión de cerebro ..... 12.5 g  
 Infusión de corazón ..... 5.0 g  
 D (+) glucosa ..... 2.0 g  
 Cloruro de sodio ..... 5.0 g  
 Di sodio hidrógeno fosfato ..... 2.5 g  
 Agua destilada .....1000.0 mL  
 pH 7.4 ± 0.1

Autoclavar

### **Caldo Luria**

Triptona .....10.0 g  
 Extracto de levadura ..... 5.0 g  
 Cloruro de sodio ..... 5.0 g  
 Agua destilada ..... 1000.0 mL  
 pH 7.0 ± 0.1

Autoclavar

### **Solución Salina Buferada con gelatina (SGB)**

NaCl ..... 8.5g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro..... 0.3 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro ..... 0.6 g  
Gelatina al 1% ..... 10.0 mL  
Agua destilada ..... 990 MI

Autoclavar.

#### **Gelatina al 1%**

Gelatina .....1g  
Agua destilada ..... 100mL

#### **SDS al 10 %**

SDS ..... 1.0 g  
Agua bidestilada ..... hasta 10 mL

#### **Bromuro de etidio (1µg/mL)**

Bromuro de etidio ..... 1.0 µg  
Agua destilada ..... hasta 1 mL

Pesar el bromuro con guantes por ser una sustancia cancerígena, disolver y almacenar solución en un frasco oscuro envuelto con papel aluminio a temperatura ambiente.

#### **Buffer de carga 2X ADN**

SDS ..... 0.5 %  
Glicerol ..... 25 %  
EDTA ..... 12mM

Azul de bromofenol ..... 0.05 %  
PH 8.0

**Buffer TAE (Tris HCl – Acetato – EDTA)**

Trizma-base ..... 4.84 g  
Ácido acético glacial ..... 1.14 mL  
EDTA di Na 0.5 M, pH 8.0 ..... 2.0 mL  
Agua bidestilada ..... hasta 1000 mL  
pH 8.0

**Gel de Agarosa al 1%**

Agarosa ..... 1.0 g  
TAE 1X.....100 mL